



UNIWERSYTET MARII CURIE–SKŁODOWSKIEJ  
W LUBLINIE

Instytut Nauk Biologicznych

mgr Monika Dzwierzyńska

**Interakcja ludzkich rybosomalnych białek P  
z katalityczną podjednostką rycyny**

*Interaction of the human ribosomal P proteins with  
the catalytic ricin A subunit*

*Rozprawa doktorska*

Promotor: Prof. dr hab. Marek Tchórzewski

Promotor pomocniczy: dr Przemysław Grela

**Lublin, 2022**

*Pracę tę dedykuję mojemu synkowi Ignasiowi*

*Składam serdeczne podziękowania  
Panu prof. dr hab. Markowi Tchórzewskiemu  
za wprowadzenie w świat biologii molekularnej oraz opiekę naukową  
dr. Przemysławowi Greli  
za nieocenioną pomoc podczas powstawania tej rozprawy  
wszystkim Pracownikom i Doktorantom  
Katedry Biologii Molekularnej  
za wszechstronną pomoc i życzliwość  
Narzeczonemu oraz Rodzicom  
Za wsparcie i wyrozumiałość*

# SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY .....	7
STRESZCZENIE .....	9
<b>I. WSTĘP .....</b>	<b>12</b>
1. Topologia rybosomu.....	12
<b>1.1 Mała podjednostka rybosomalna .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Duża podjednostka rybosomalna .....</b>	<b>18</b>
2. Struktura rybosomu – centra aktywne .....	20
<b>2.1 Centrum dekodujące .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Centrum peptydylotransferazy .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Bakteryjne Centrum GTPazowe.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Eukariotyczne centrum GTPazowe .....</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Pozarybosomalna aktywność białek P.....</b>	<b>45</b>
3. Białka RIP - Ribosomal Inactivating Proteins.....	46
<b>II. CEL PRACY .....</b>	<b>55</b>
<b>III. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>56</b>
1. Manipulacje genetyczne .....	56
<b>1.1. Przygotowywanie konstruktów genetycznych ludzkich białek P1/P2 i ich</b> <b>form delecyjnych P1<math>\Delta</math>C/P2<math>\Delta</math>C .....</b>	<b>56</b>
2. Heterologiczna ekspresja ludzkich białek P w <i>Escherichia coli</i> .....	58
3. Oczyszczanie ludzkiego rekombinowanego białka P1 i formy delecyjnej P1 $\Delta$ C.....	59

4.	Oczyszczanie ludzkiego rekombinowanego białka P2 i formy delecyjnej P2 <sub>ΔC</sub> .....	60
5.	Formowanie kompleksów białek P.....	61
6.	Heterologiczna ekspresja i oczyszczanie aktywnej katalitycznie podjednostki rycyny (RTA) .....	62
7.	Charakterystyka biochemiczna i biofizyczna otrzymanych białek rekombinowanych	64
	<b>7.1. Chromatografia sączenia/sita molekularnego .....</b>	<b>64</b>
	<b>7.2. Dichroizm kołowy (ang. <i>Circular Dichroism</i>, CD).....</b>	<b>64</b>
	<b>7.3. NanoDSF - pomiar punktu topnienia (ang. <i>Melting point</i>, T<sub>m</sub>).....</b>	<b>66</b>
	<b>7.4. Spektrometria mas .....</b>	<b>66</b>
8.	Analiza interakcji dimerów białek P1-P2 z katalityczną podjednostką rycyny (RTA)	67
	<b>8.1. Termoforeza mikroskalowa (Microscale Thermophoresis, MST).....</b>	<b>68</b>
	<b>8.2. Interferometria bio-warstwowa BLI .....</b>	<b>70</b>
<b>IV.</b>	<b>WYNIKI.....</b>	<b>75</b>
1.	Heterologiczna ekspresja ludzkich białek rybosomalnych P1 i P2, ich form delecyjnych P1 <sub>ΔC</sub> i P2 <sub>ΔC</sub> oraz katalitycznej podjednostki rycyny - RTA.....	75
2.	Oczyszczanie ludzkich białek rybosomalnych P1/P2, ich form delecyjnych P1 <sub>ΔC</sub> / P2 <sub>ΔC</sub> oraz katalitycznej podjednostki rycyny .....	78
	<b>2.1. Oczyszczanie ludzkich rybosomalnych białek P1/P1<sub>ΔC</sub>.....</b>	<b>78</b>
	<b>2.2 Oczyszczanie ludzkich rybosomalnych białek P2/P2<sub>ΔC</sub>.....</b>	<b>80</b>
	<b>2.3 Oczyszczanie katalitycznej podjednostki rycyny – RTA .....</b>	<b>86</b>

3. Otrzymywanie dimerów ludzkich białek P .....	87
4. Charakterystyka biochemiczna i biofizyczna kompleksów rekombinowanych białek P1/P2.....	99
<b>4.1 Analiza z wykorzystaniem analitycznego sita molekularnego - SEC .....</b>	<b>99</b>
<b>4.1 Dichroizm kołowy (ang. <i>circular dichroism</i> - CD) .....</b>	<b>108</b>
<b>4.2 Ocena stabilności termicznej kompleksów białek P1/P2 .....</b>	<b>113</b>
<b>4.3 Spektrometria mas w warunkach niedenaturujących (ang. <i>native mass spectrometry</i>, „native”-MS) .....</b>	<b>115</b>
5. Analiza interakcji dimerów białek P1-P2 z katalityczną podjednostką rycyny .....	121
<b>5.1 Termoforeza mikroskalowa (ang. <i>microscale thermophoresis</i>, MST).....</b>	<b>121</b>
<b>5.2 Interferometria bio-warstwowa (ang. <i>bio-layer interferometry</i>, BLI) .....</b>	<b>126</b>
<b>V.    DYSKUSJA .....</b>	<b>131</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>148</b>
<b>VI.   BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>153</b>

## WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

$\epsilon$	molowy współczynnik absorpcji
BLI	(ang. <i>Biolayer Interferometry</i> ), interferometria biowarstwowa
CD	(ang. <i>Circular Dichroizm</i> ), dichroizm kołowy
CP	(ang. <i>Central Protuberance</i> ), wyniosłość centralna
Cryo - EM	(ang. <i>Cryo - Electron Microscopy</i> ), mikroskopia krio-elektronowa
CTD	(ang. <i>C - terminal Domain</i> ), domena C-terminalna
DC	(ang. <i>Decoding Centre</i> ), centrum dekodujące znajdujące się na małej podjednostce rybosomu,
DTT	Ditriotreitol
EDTA	Sól sodowa kwasu etylenodiamino-tetraoctowego
EF 2	(ang. <i>Elongation factor 2</i> ), eukariotyczny czynnik elongacyjny 2
EF G	(ang. <i>Elongation factor G</i> ), prokariotyczny czynnik elongacyjny G
EF-Tu	(ang. <i>Elongation Factor Thermo Unstable</i> ), prokariotyczny czynnik elongacyjny
FL	(ang. <i>Fluorescence</i> ), fluorescencja
GAC	(ang. <i>GTPase Activating Centre</i> ), centrum stymulujące aktywność GTPazową
GAP	(ang. <i>GTPase Activating Protein</i> ), białko aktywujące aktywność GTPazową
GCN2	(ang. <i>General Control Conderepressible 2</i> ), kinazą serynowo/treoninowo-białkowa
GDP	guanozynodifosforan
GMP	guanozynomonofosforan
GTP	guanozynotrifosforan
IEF	(ang. <i>Isoelectric focusing</i> ), ogniskowanie izoelektryczne
IPTG	Izopropylo- $\beta$ -D-tiogalaktozyd
LB	(ang. <i>Lysogeny Broth</i> ), pożywka lizogenna, bulion lizogeny
LSU	(ang. <i>large ribosomal subunit</i> ), duża podjednostka rybosomu
Native-Page	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych
NMR	(ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ), spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

MDa	Mega Dalton ( $10^6$ Da), jednostka masy atomowej
OD	(ang. <i>Optical Density</i> ), gęstość optyczna
PDB	(ang. <i>Protein Data Bank</i> ), biologiczna baza danych gromadząca dane o strukturze przestrzennej białek i kwasów nukleinowych
PMSF	(ang. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> ), fluorek fenylometylosulfonylu
PTC	(ang. <i>peptidyltransferase centre</i> ), centrum peptydylotransferazy
SAXS	(ang. <i>Small-Angle X-ray Scattering</i> ), metoda niskokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich
SDS	Siarczan dodecyłu, sól sodowa
SDS-PAGE	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących z SDS
SEC	(ang. <i>Size Exclusion Chromatography</i> ), chromatografia sita molekularnego, sączenie molekularne
SRL	(ang. <i>Sarcin Ricin Loop</i> ), pętla sarcynowo-rycynowa
SSU	(ang. <i>small ribosomal subunit</i> ), mała podjednostka rybosomu
RB	(ang. <i>Ribosomal Stalk</i> ), „kciuk” rybosomalny
TRIS	(ang. <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> ), trój-(hydroksymetylo)aminometan



## STRESZCZENIE

Eukariotyczny „kciuk” rybosomalny jest kompleksem białkowym wchodzącym w skład rybosomalnego centrum GTPazowego, które odpowiedzialne jest za stymulację hydrolizy GTP za pośrednictwem translacyjnych GTPaz, białek które wspomagają rybosom w procesie translacji. Kompleks „kciuka” zbudowanym jest z rybosomalnego białka uL10 oraz unikalnych dla eukariontów białek P1/P2. Dwa heterodimery P1-P2 razem z białkiem uL10 tworzą pentameryczny kompleks o konfiguracji  $uL10(P1-P2)_2$ . Kompleks pentameryczny jest odpowiedzialny za interakcję z translacyjnymi GTPazami, odgrywając rolę w ich wiązaniu do rybosomu oraz bierze udział w stymulacji hydrolizy GTP za pośrednictwem translacyjnych GTPaz. W konsekwencji, kompleks ten jest odpowiedzialny za wysoką procesywność rybosomu w translacji. Rybosomalne białka wchodzące w skład pentamerycznego kompleksu zawierają wysoce konserwatywny fragment C-terminalny, który jest krytyczny dla interakcji z translacyjnymi GTPazami. Uważa się, że fragment C-terminalny są główną platformą wiążącą rodzinę translacyjnych GTPaz, zapewniających pełną funkcjonalność dla rybosomu. Co ciekawe, szereg badań wykazał, że białka te są również celem dla białek z rodziny RIP (ang. *Ribosomal Inactivating Protein*), które są uważane za jedne z najbardziej toksycznych białek w przyrodzie. Białka RIP prowadzą depurynację rRNA w obrębie centrum GTPazowego, co prowadzi do zahamowania translacji za pośrednictwem rybosomu, a konsekwencją tego jest śmierć komórki.

Celem badawczym w niniejszej pracy było zdefiniowanie roli poszczególnych białek P, a przede wszystkim roli indywidualnych fragmentów C-terminalnych w interakcji z białkiem RIP - rycyną. W tym celu zbadano interakcję ludzkich kompleksów białek P oraz ich form delecyjnych z katalityczną podjednostką rycyny (RTA). Należy podkreślić, że mimo wielu lat badań, interakcja białek RIP z rybosomalnymi białkami P nie była dokładnie zbadana. Opisano udział białek P i ich C-końców w wiązaniu białek RIP wykorzystując szereg badań biochemicznych, ale analizy przeprowadzono wyłącznie w tzw. izolowanych układach doświadczalnych z użyciem różnych form oligomerycznych białek P, takich jak homodimery P2 czy oligomery P1, bądź z wykorzystaniem krótkich peptydów. Z uwagi na fakt, iż białka P preferencyjnie tworzą istotne biologicznie heterodimery P1-P2, które uznaje się za centralny element funkcjonalny „kciuka” rybosomalnego, w niniejszej pracy zbadano interakcję dimeru P1-P2 z białkami RIP, wykorzystując heterodimer jako tzw. najmniejszą funkcjonalną jednostkę strukturalną „kciuka”. W ramach prac badawczych opracowano *de*

*novo* konstrukty genetyczne pozwalające na otrzymanie tzw. delecyjnych form ludzkich białek P, w których usunięto 16-cie konserwatywnych, C-końcowych aminokwasów (odpowiednio nazwane jako P1<sub>ΔC</sub> dla białka P1 pozbawionego fragmentu CTD oraz P2<sub>ΔC</sub> dla białka P2, także nie posiadającego fragmentu C-terminalnego). Zakres prac badawczych obejmował szereg działań w zakresie biologii molekularnej oraz analiz biofizycznych, m.in.: inżynierię genetyczną oraz inżynierię białka, a w tym chromatografię jonowymienną (ang. *Size Exclusion Chromatography*, SEC), dichroizm kołowy (ang. *Circular Dichroism*, CD), nano-różnicową fluorymetrię skaningową (ang. *nano differential scanning fluorimetry*, nanoDSF), spektrometrię mas w warunkach niedenaturujących (ang. *Native Mass Spectrometry*, „native”-MS). Ponadto zastosowano techniki do analizy oddziaływań molekularnych białko-białko takie jak termoforeza mikroskalowa (ang. *Microscale Thermophoresis*, MST) oraz interferometria bio-warstwowa (ang. *Bio-layer Interferometry*, BLI).

Pierwszym zadaniem było otrzymanie rekombinowanych białek P1, P2 oraz ich form delecyjnych P1<sub>ΔC</sub>, P2<sub>ΔC</sub>. W tym celu przeprowadzono heterologiczną ekspresję białek P i w zależności od parametrów biofizycznych poszczególnych białek wykonano ich oczyszczanie. Otrzymane poszczególne białka rekombinowane zostały wykorzystane do uformowania kompleksów białkowych: heterodimeru P1-P2, heterodimerycznych form delecyjnych - P1-P2<sub>ΔC</sub>, P1<sub>ΔC</sub>-P2, P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> oraz homodimerów P2-P2 i P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>. W kolejnym etapie przeprowadzono charakterystykę strukturalną otrzymanych kompleksów białek P z wykorzystaniem metod biofizycznych takich jak SEC, CD, nanoDSF oraz „native”-MS. Równolegle, wykonano heterologiczną ekspresję katalitycznej podjednostki rycyny (RTA). Otrzymane białko rekombinowane oczyszczono na drodze chromatografii powinowactwa oraz wykonano, analogiczną do analiz dimerów, charakterystykę biofizyczną. Badanie interakcji białko:białko przeprowadzono za pomocą dwóch metod badawczych: MST oraz BLI. W ramach badań wyznaczono wartości stałych dysocjacji, a tym samym określono poziom powinowactwa poszczególnych kompleksów do RTA. Uzyskane wyniki wskazały, że C-terminalny region białek P jest odpowiedzialny za oddziaływanie z białkami RIP, jednakże badania te pozwoliły na precyzyjne zdefiniowanie roli poszczególnych C-terminalnych elementów, wskazując na nierównocenną rolę tychże fragmentów polipeptydowych w obrębie białka P1 i P2; mianowicie zaobserwowano, że dominującą rolę w interakcjach z RTA wykazuje fragment C-terminalny pochodzący z białka P1. Wyniki analiz sugerują, że nie tylko fragment C-terminalny, ale także

przestrzenna organizacja dimeru P1-P2 ma znaczenie dla interakcji z RTA. Na bazie uzyskanych wyników zaproponowano model interakcji heterodimeru P1-P2 z uwzględnieniem organizacji przestrzennej kompleksu, wskazując, że układ dwóch białek P1-P2 zapewnia właściwą orientację przestrzenną fragmentu C-terminalnego białka P1, co promuje interakcję z białkami RIP.

# I. WSTĘP

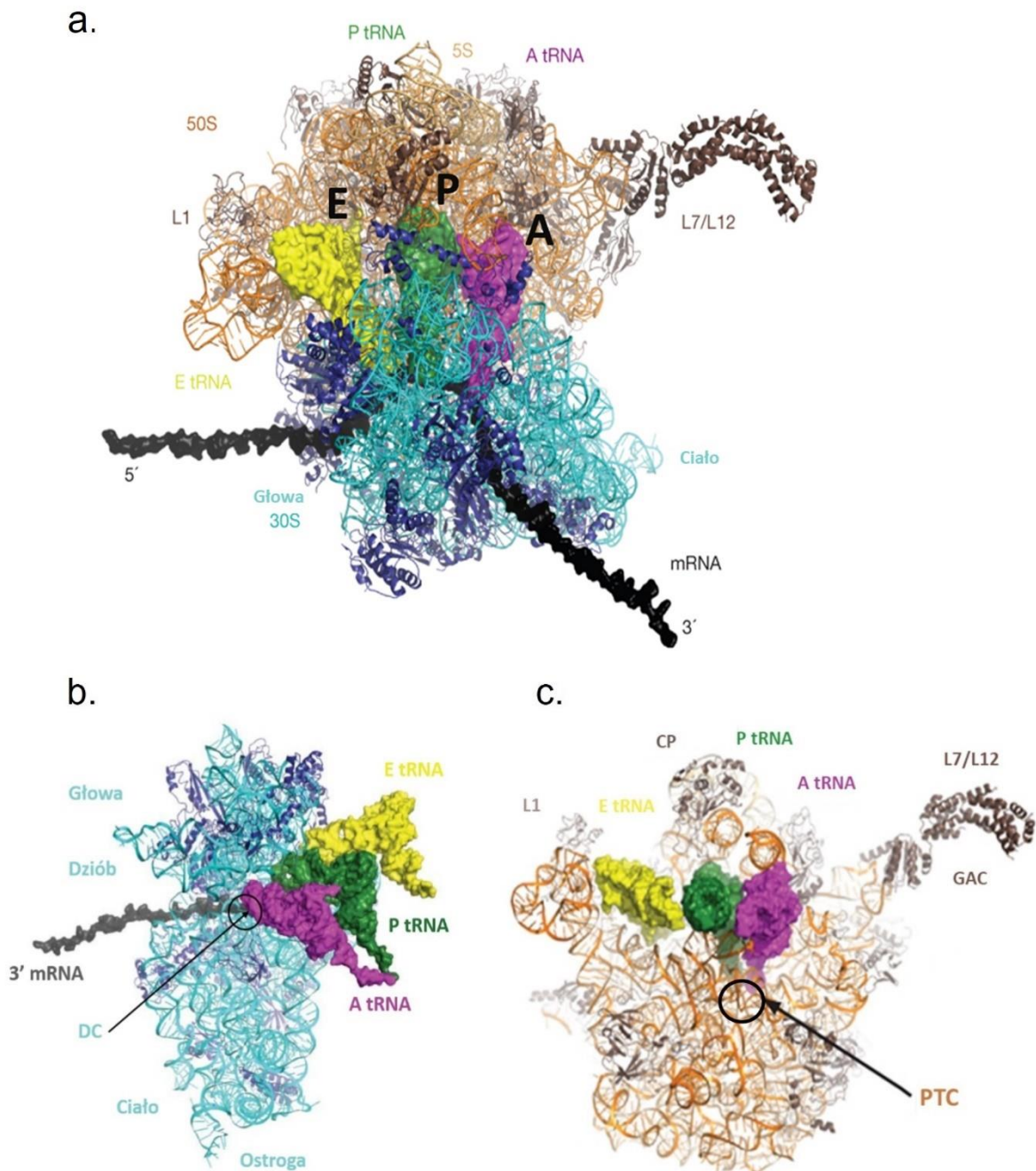
Aktualny stan wiedzy na temat centralnego elementu maszynerii translacyjnej tj. rybosomu jest wynikiem kilkudziesięciu lat badań w zakresie analiz strukturalnych, biochemicznych oraz biofizycznych, dzięki którym opracowano funkcjonowanie rybosomu na poziomie molekularnym [1]. Rybosom jest rozpatrywany jako nano-maszyna stanowiąca rdzeń maszynerii translacyjnej u wszystkich organizmów, gwarantujący wypełnienie dwóch kluczowych funkcji w procesie translacji: dekodowanie informacji genetycznej zawartej na matrycy mRNA i formowanie wiązania peptydowego, czego rezultatem jest synteza funkcjonalnego białka. Rybosom to makromolekuła białkowo-rybonukleinowa, której głównym elementem funkcjonalnym jest rybosomalny RNA – rRNA i z tej racji rybosom jest postrzegany jako rybozym, ponieważ jego dwie najważniejsze aktywności (dekodowanie i synteza wiązania peptydowego) powiązane są wyłącznie z rRNA [2].

## 1. Topologia rybosomu

Dzięki rozwojowi technik biologii strukturalnej takich jak analizy krystalograficzne oraz mikroskopia elektronowa opracowano model strukturalny rybosomu na poziomie atomowym, zaś analizy biochemiczno-biofizyczne miały istotny wkład poznawczy w aspekt funkcjonalny, komplementując badania strukturalne. Analizy strukturalno-funkcjonalne rybosomu początkowo wykonano na modelu prokariotycznym, a w kolejnych latach przybliżono funkcjonowanie rybosomy eukariotycznego. Przełom wieków XX/XXI to opracowanie struktury na poziomie atomowym dużej podjednostki 50S pochodzącej z archeona *Haloarcula marismortui* [3] oraz małej podjednostki 30S bakterii *Thermus thermophilus* [4], co położyło podwaliny i stało się podstawą do interpretacji molekularnej każdej kolejnej struktury rybosomów [5]. Szczytowym osiągnięciem w analizach było opracowanie modelu rybosomu bakteryjnego pochodzącego z bakterii *Escherichia coli*, w stanie funkcjonalnym, co pozwoliło na opisanie wszystkich elementów strukturalno-funkcjonalnych występujących w każdym rybosomie, niezależnie od jego pochodzenia, a tym samym dało wgląd w funkcjonowanie rybosomu na poziomie molekularnym (Ryc. 1). Analizy te pozwoliły na wgląd w poszczególne elementy rybosomu na poziomie atomowym,

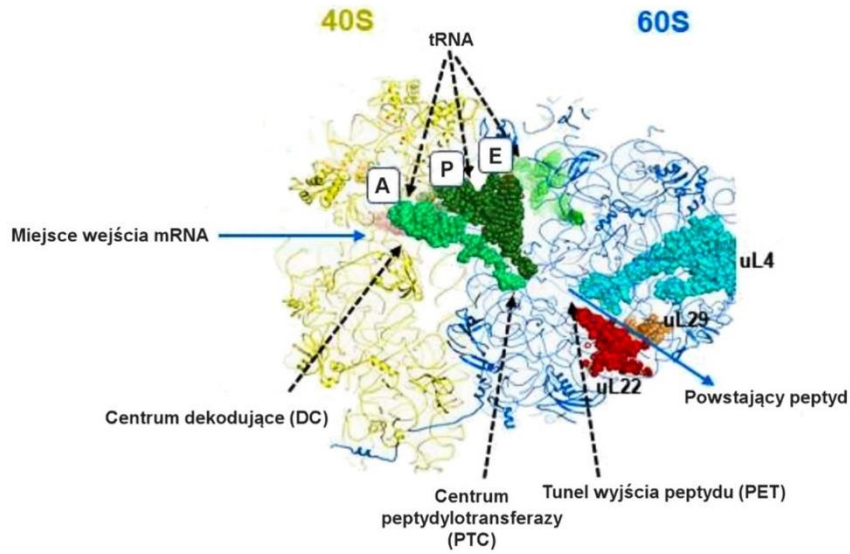
włączając w to elementy o wysokiej mobilności w obrębie dużej podjednostki jak na przykład wyniosłość boczna L1 [6], czy też wyniosłość boczna L7/L12, wg. nowej nomenklatury bL12 [7,8], określana także jako tzw. „kciuk” rybosomalny (ang. *ribosomal stalk*), (Ryc. 1b). W konsekwencji, prace badawcze zaowocowały także opisaniem struktury rybosomu eukariotycznego, włączając w to rybosom ludzki (Ryc. 2).

*Escherichia coli*

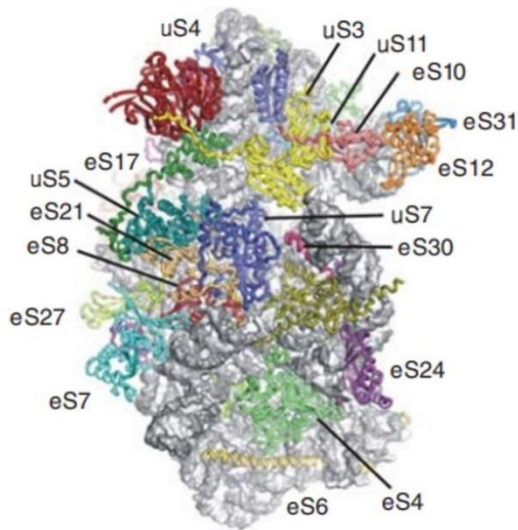


**Ryc. 1. Struktura rybosomu prokariotycznego na przykładzie *Escherichia coli* [5]. a.** Struktura rybosomu 70S wraz z mRNA (oznaczony kolorem czarnym) oraz tRNA w miejscu A (kolor różowy), P (kolor zielony) i E (kolor żółty) z wyszczególnioną dużą podjednostką 50S (kolor brązowy) i małą podjednostką 30S (kolor turkusowy), **b.** Struktura podjednostki 30S z zaznaczonymi elementami strukturalnymi oraz miejscami wiązania się tRNA w trakcie syntezy białek: miejscem A (kolor fioletowy), P (kolor zielony) oraz miejscem E (kolor żółty). **c.** Duża podjednostka 50S z zaznaczonym centrum peptydylotransferazy (PTC) oraz centrum GTPazowym (GAC).

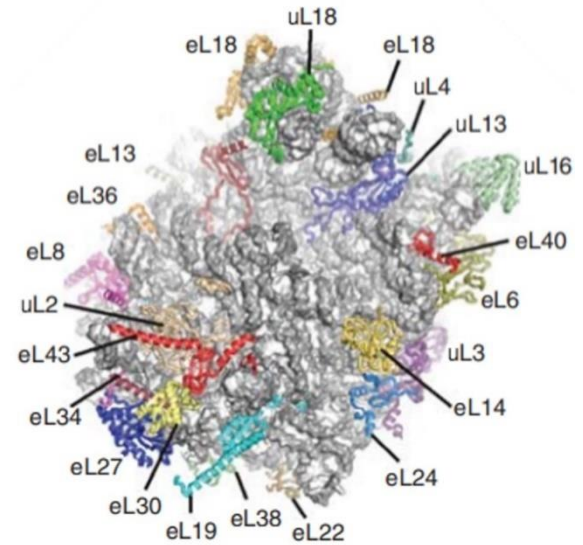
a.



b.



c.



**Ryc. 2. Struktura rybosomu ludzkiego 80S [9–12]. a.** struktura rybosomu z zaznaczonymi typowymi miejscami aktywnymi rybosomu. Kolorem żółtym oznaczono małą podjednostkę 40S, zaś niebieskim dużą podjednostkę rybosomalną 60S. Wskazane zostały centra aktywne rybosomu (DC, PTC), trzy charakterystyczne miejsca na rybosomie: miejsce A, P i E oraz miejsca wejścia mRNA i wyjścia powstającego peptydu. Kolorem czerwonym zaznaczono białko uL22, kolorem pomarańczowym białko uL29, a turkusowym białko uL4 **b.** mała podjednostka rybosomalna 40S z rozróżnionymi kolorystycznie i podpisanymi białkami oraz 18S rRNA (kolor szary), **c.** duża podjednostka rybosomalna 60S z rozróżnionymi kolorystycznie i podpisanymi białkami oraz 28S rRNA (kolor szary).

Rybosom, niezależnie od rodzaju organizmu, z którego pochodzi, składa się z dwóch zasadniczych elementów strukturalno-funkcjonalnych, tzw. podjednostek rybosomalnych, mniejszej oraz większej. W zależności od przynależności ewolucyjnej rybosomy różnią się kompozycją białek jak i rRNA, a tym samym masą molekularną, co nadaje im charakterystyczne cechy dla prokariotów i eukariotów. Rybosom prokariotyczny (bakteryjny) posiada masę atomową 2,5 MDa, natomiast rybosomy eukariotyczne są większe, posiadają masę 3,2 MDa np. rybosom z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* czy 4 MDa jak rybosomy ludzkie. Ze względów historycznych, wielkość rybosomu jest także opisywana w formie stałej Svendberga. I tak, rybosom bakteryjny posiada wartość 70 jednostek Svendberga (70S), jego mała podjednostka - 30S, natomiast duża - 50S. Z kolei wartość stałej sedymentacji rybosomu eukariotycznego to 80 jednostek Svendberga (80S), a poszczególne podjednostki charakteryzują się odpowiednio wartościami 40S i 60S [13]. Rybosom zbudowany jest z dwóch podstawowych składowych: rybosomalnego RNA (rRNA) oraz białek rybosomalnych. W zależności od pochodzenia rybosomu poszczególne składowe rybosomu obecne są w różnych ilościach i proporcjach, co obrazuje Tabela 1.

**Tabela 1.** Składowe rybosomu: rybosomalne RNA oraz liczba białek poszczególnych podjednostek rybosomów o różnym pochodzeniu [14,15].

Źródło rybosomu	Mała podjednostka		Duża podjednostka	
	RNA (S)	Białka (ilość)	RNA (S)	Białka (ilość)
Bakterie	16S	21	23S, 5S	33
Archea	16S	28	23S, 5S	40
Eukarionty	18S	33	5.8S, 25/28S, 5S	49
Chloroplasty	16S	25	23S, 5S, 4.5S	35
Mitochondria roślinne	18S	44	26S, 5S	49
Mitochondria drożdżowe	15S	34	21S	46
Mitochondria ssacze	12S	30	16S	50

Rybosom bakteryjny z *E. coli*, składa się z małej podjednostki 30S, która zawiera jedną cząsteczkę rRNA – 16S rRNA, oraz 21 białek opisywanych jako S1-S21. Duża podjednostka 50S zbudowana jest z dwóch cząsteczek rRNA - 5S oraz 23S rRNA i 36 białek: L1-L36. Zgodnie z zaproponowaną w 2014 roku nową nomenklaturą białek rybosomalnych



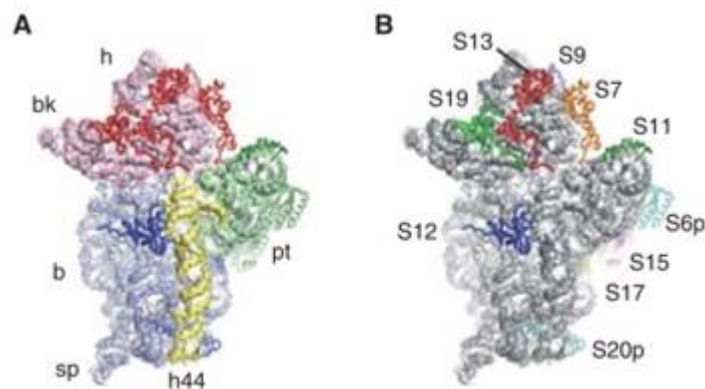
zostały one poprzedzone przedrostkami: „u”, który określa białka uniwersalne (ang. *universal*), występujące w rybosomach we wszystkich domenach życia, przedrostek „e” jest stosowany dla białek eukariotycznych (ang. *eukaryotic*), zaś „b” dla białek bakteryjnych (ang. *bacterial*); i tak u bakterii mamy białka: uS2, uS3, uS4, uS5, uS7, uS8, uS9, uS10, uS11, uS12, uS13, uS14, uS15, uS17, uS19, bS1, bS6, bS16, bS18, bS20 i bS21 na małej podjednostce, natomiast na dużej: uL1, uL2, uL3, uL4, uL5, uL6, uL10, uL11, uL13, uL14, uL15, uL16, uL18, uL22, uL23, uL24, uL29, uL30, oraz bL9, bL12, bL17, bL19, bL20, bL21, bL25, bL27, bL28, bL31, bL32, bL33, bL34, bL35 i bL36 [7].

Rybosom eukariotyczny (80S) zawiera 18S rRNA i 33 białka w obrębie małej podjednostki 40S, z których część nosi nazwy odpowiednie dla bakteryjnych homologów, z przedrostkiem „u” (ang. *universal*), jak: uS2, uS3, uS4, uS5, uS7, uS8, uS9, uS10, uS11, uS12, uS13, uS14, uS15, uS17, natomiast białka charakterystyczne dla domeny *Eucaryotes* poprzedzone są przedrostkiem „e” (ang. *eucaryotic*), i są to białka: eS1, eS4, eS6, eS7, eS8, eS10, eS12, eS17, eS19, eS21, eS24, eS25, eS26, eS27, eS28, eS30, eS31. Dużą podjednostkę (60S) budują trzy cząsteczki rRNA, odpowiednio 5S, 25/28S oraz dodatkowa cząsteczka - 5.8S rRNA oraz 49 białek (L1-L43), odpowiednio określane w zależności od posiadania bakteryjnego homologu przedrostkiem „u” bądź przy zachowaniu specyficzności dla eukariontów przedrostkiem „e”. Wyjątek stanowią białka P1 i P2, które zachowały swoją pierwotną nazwę. Białko niegdyś określane wśród eukariontów mianem białka P0, obecnie – uL10. W dalszej części pracy wykorzystywane będzie nazewnictwo zgodne z nową nomenklaturą białek rybosomalnych [7].

## 1.1 Mała podjednostka rybosomalna

Rozpatrując organizację strukturalną w obrębie małej podjednostki rybosomalnej, układ strukturalny tego rybosomalnego elementu jest podobny i występuje we wszystkich domenach życia; wyróżnia się takie elementy jak: głowę, ramię, dziób, platformę, ciało oraz ostrogę (Ryc. 1b, 2b, 3). Ponadto, w obrębie mniejszej podjednostki rybosomalnej można wyróżnić elementy rRNA tworzące trzy kompaktowe domeny (domena 5', domena centralna i domena 3') oraz jedną wydłużoną domenę (domena mniejsza 3'). Domena 5' znajduje się na obszarze ciała małej podjednostki, domena centralna w obrębie platformy, zaś domena 3' w obrębie głowy. Domena mniejsza 3', będąca długą helisą (h44), rozciąga się od regionu między głową i ciałem ku dołowi małej podjednostki, natomiast łącznikiem

między głową i ciałem podjednostki jest helisa h28. Taka organizacja nadaje mniejszej podjednostce tzw. „elastyczność” czyli możliwość zmian strukturalnych w obrębie poszczególnych domen, co jest kluczowe do spełniania swojej funkcji – dekodowania informacji genetycznej zawartej w sekwencji matrycowego RNA (mRNA) poprzez zmiany konformacyjne, które stanowią istotny element w procesie dekodowania mRNA; ponadto ta plastyczność umożliwia także zajście procesu translokacji, kluczowego kroku w cyklu elongacyjnym, w który mRNA i tRNA przesuwiają się o jeden kodon względem rybosomu [4,16].

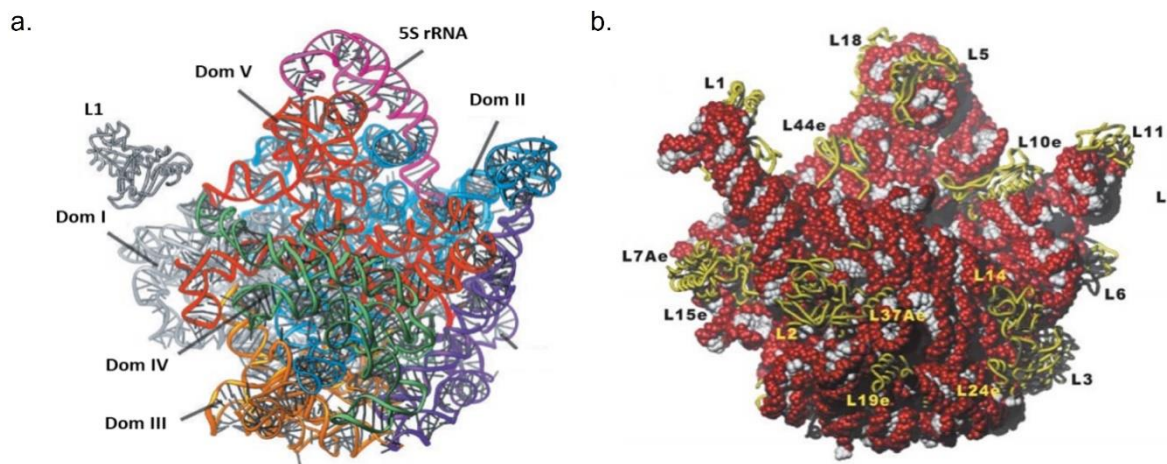


**Ryc. 3. Struktura małej podjednostki 30S** [12,17]. **Lewy panel:** domeny 16S rRNA, elementy topologiczne małej podjednostki bakteryjnej; oznaczenia literowe: h-głowa, bk-dziób, b-ciało, sp-ostroga, pt-platforma oraz helisa h44 (kolor żółty). **Prawy panel:** domeny 16S rRNA zaznaczone kolorem szarym, białka rybosomalne małej podjednostki podpisano i rozróżniono kolorystycznie.

## 1.2 Duża podjednostka rybosomalna

Rozpatrując topologię rybosomu dużej podjednostki możemy wyróżnić trzy charakterystyczne elementy strukturalne zwane także wyniosłościami, tj. wyniosłość/struktura uL1, wyniosłość centralną (ang. *central protuberance*; CP) oraz w przypadku rybosomu bakteryjnego wyniosłość bL12 a w przypadku eukariotycznego analogiczną wyniosłość P (Ryc. 1c i Ryc. 2c). W skład wyniosłości uL1, wchodzi rybosomalne białko uL1 oraz helisy H76-H78 23S rRNA, a rolą wyniosłości uL1 jest wspomaganie ukierunkowanego ruchu tRNA na rybosomie oraz kontrola uwalniania tRNA z miejsca E [18–20]. Wyniosłość bL12 jest umiejscowiona w pobliżu miejsca A. Składa się z rybosomalnych białek uL11, uL10 oraz dwóch dimerów bL12, które są związane z białkiem uL10. bL12 jest jedynym białkiem rybosomalnym nie wchodzącym w bezpośrednie interakcje z rybosomalnym rRNA, podczas gdy uL10 i uL11 są zakotwiczone w helisach H43 i H44 23S rRNA, formując tym samym strukturę zwaną

„kciukiem” rybosomalnym. Wyniosłość bL12 jest promotorem przyłączenia się translacyjnych GTPaz do rybosomalnego miejsca A, a ponadto pełni funkcję stabilizacji tych czynników w obrębie rybosomu [8,21,22]. Rybonukleinowa składowa dużej podjednostki w postaci sześciu elementów 23S rRNA formuje jednolity element większej podjednostki rybosomalnej, w przeciwieństwie do elastycznej struktury małej podjednostki rybosomalnej. Częsteczka 5S rRNA, występująca jako siódma domena 23S rRNA, znajduje się w obszarze wyniosłości centralnej i formuje element ulegający interakcji z mniejszą podjednostką rybosomalną (Ryc. 4a). Na szczególną uwagę zasługują białka rybosomalne. Większość białek dużej podjednostki umiejscowiona jest na jej zewnętrznej powierzchni, eksponowanej do środowiska komórki, z kilkoma tylko obecnymi w przestrzeni między podjednostkowej (Ryc. 4b) [3,23].

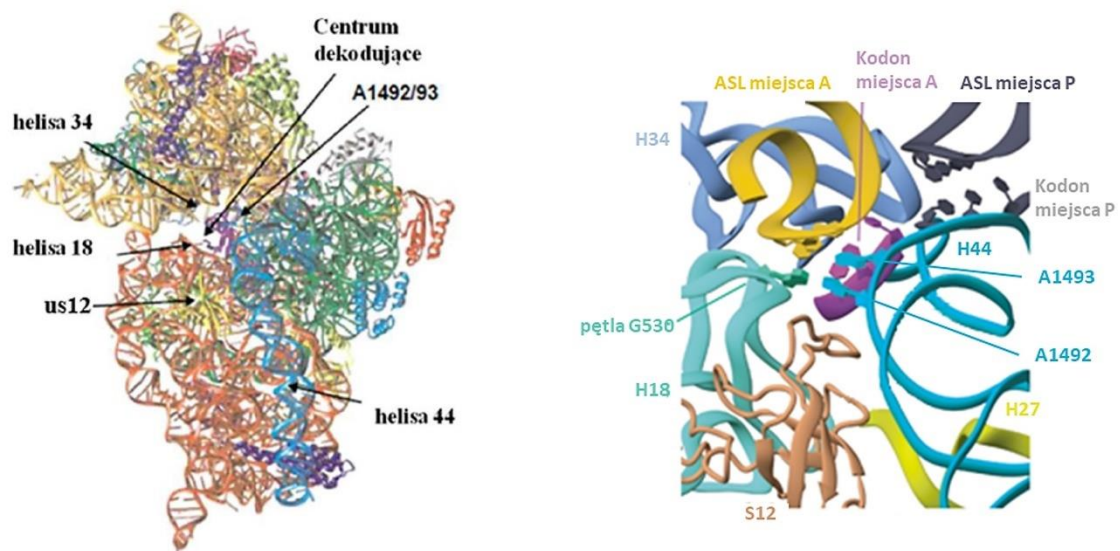


**Ryc. 4. Struktura dużej podjednostki 50S.** a. poszczególne domeny rRNA zostały wyróżnione kolorami oraz podpisane [3], b. Struktura dużej podjednostki 50S. 23S i 5S RNA są oznaczone kolorami czerwonym (szkielet cukrowo-fosforanowy) oraz szarym (zasady). Komponent białkowy został przedstawiony kolorem żółtym [23].

## 2. Struktura rybosomu – centra aktywne

### 2.1 Centrum dekodujące

Proces specyficznego oddziaływania poszczególnych zasad w obrębie kompleksu kodon - antykodon jest podstawą procesu dekodowania informacji genetycznej przez rybosom, a tym samym prawidłowej selekcji poprawnego aminoacylo-tRNA w procesie przyłączania właściwego aminokwasu do rosnącego łańcucha polipeptydowego [24]. Realizacja tego procesu zachodzi w centrum dekodującym, które współdziała funkcjonalnie i strukturalnie z trzema miejscami, które odpowiedzialne są za oddziaływanie rybosomu z tRNA, cząsteczką rozpatrywaną jako kluczowy element w procesie dekodowania i formowania łańcucha polipeptydowego. tRNA oddziałuje z rybosomem za pośrednictwem trzech miejsc. I tak w obrębie rybosomu wyróżniamy trzy charakterystyczne miejsca wiążące różne typy tRNA (Ryc. 1a): miejsce aminoacylowe „A” (ang. *aminoacyl-site*), do którego wiąże się tRNA w postaci aminoacylo-tRNA (aa-tRNA) oraz w którym następuje dekodowanie informacji genetycznej zawartej na mRNA, zgodnie z zasadą interakcji kodon-antykodon; miejsce peptydylowe „P” (ang. *peptidyl-site*), do którego wiąże się podczas etapu inicjacji translacji inicjatorowy tRNA, a w procesie elongacji związany jest peptydylo-tRNA, czyli tRNA z nowo syntetyzowanym polipeptydem; miejsce „E” (ang. *exit-site*), w którym w trakcie etapu elongacji zakotwiczony jest wolny tRNA, który opuszcza rybosom [25]. W obrębie miejsca A zlokalizowane jest centrum dekodujące, w którym następuje interakcja kodonu i antykodonu. Centrum to zlokalizowane jest na granicy czterech różnych domen wchodzących w skład takich elementów mniejszej podjednostki jak głowa, ramienia, platformy oraz helisy 44 z rRNA (h44) (Ryc. 5a). W obrębie h44 rRNA zlokalizowane są trzy kluczowe i konserwatywne zasady: G530 z domeny ramienia oraz A1492 i A1493 leżące w obrębie wewnętrznej pętli helisy h44 (przyjęto bakteryjną numerację rRNA). Zasady te ulegają specyficznym oddziaływaniom z tzw. mini-helisy utworzoną w wyniku interakcji kodon-antykodon, przede wszystkim z dwiema pierwszymi zasadami kompleksu kodon/antykodon i odpowiadają za tzw. weryfikację strukturalną kompleksu, co jest kluczem w poprawnym dekodowaniu informacji genetycznej przez rybosom (Ryc. 5b) [16]. Jedynym białkiem znajdującym się w pobliżu centrum dekodującego jest białko uS12, jednakże nie bierze ono bezpośredniego udziału w procesie dekodowania [26,27].



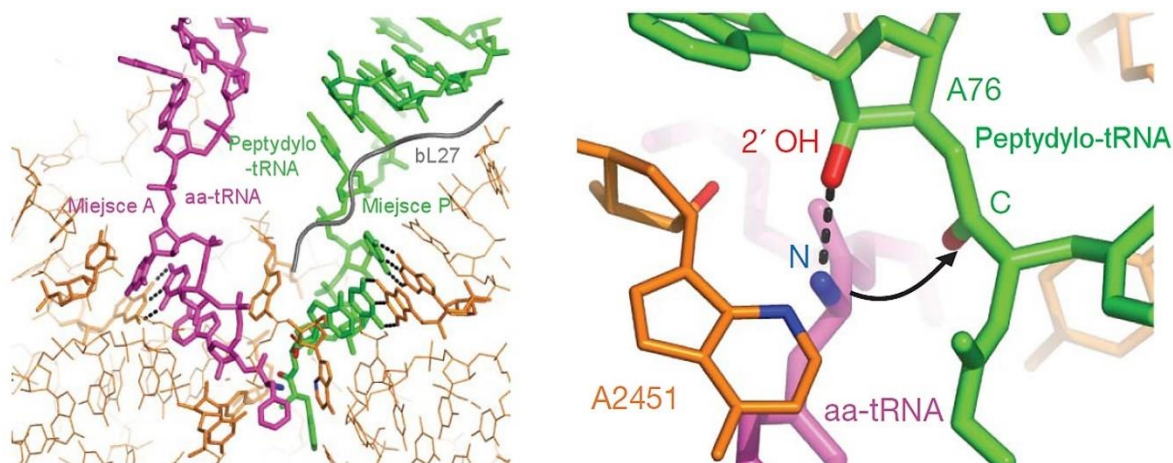
**Ryc. 5. Centrum dekodujące** [16]. **Panel lewy:** struktura podjednostki 30S z *T. thermophilus*. Zaznaczone zostały trzy główne helisy 16S rRNA (H18, H34, H44) oraz białko uS12 wchodzące w skład centrum dekodującego, **Panel prawy:** Kluczowe nukleotydy centrum dekodującego. Kolor fioletowy – model mRNA pokazujący kodon w miejscu A, nukleotydy 16S rRNA - G530 w helisie h18 (kolor turkusowy) oraz A1492 i 1493 w helisie h44 (kolor niebieski). Kolorem żółtym oznaczono antycodon (ang. *anticodon stem-loop*, ASL) należący do aa - tRNA znajdującego się w miejscu A.

## 2.2 Centrum peptydylotransferazy

W obrębie dużej podjednostki rybosomalnej znajduje się centrum peptydylotransferazy (ang. *peptidyl transferase centre*, PTC) biorące udział w syntezie wiązania peptydowego [28]. Analizy strukturalne wskazały, że centrum PTC składa się wyłącznie z rRNA [3]. Biorąc pod uwagę wysoki stopień konserwatywności sekwencji rRNA, w szczególności w centrum PTC, centrum to i zasada jego funkcjonowania jest identyczna w obrębie wszystkich organizmów, podobnie jak centrum dekodujące, które także cechuje się wysoką konserwatywnością strukturalno-funkcjonalną w obrębie wszystkich trzech domena życia. Główną reakcją zachodzącą w obrębie centrum PTC jest reakcja, w której to  $\alpha$ -aminowa grupa należąca do reszty aminokwasowej w aminoacylo-tRNA reaguje z atomem węgla grupy karbonylowej należącej do reszty aminokwasowej związanej z peptydylo-tRNA w celu utworzenia nowego wiązania amidowego popularnie nazywanego wiązaniem peptydowym (Ryc. 6). W procesie formowania wiązania peptydowego, kluczowymi elementami biorącym udział w katalizie jest zasada adeninowa A2451 rRNA, a przede wszystkim grupa hydroksylowa 2'OH adeniny A76 pochodząca z peptydylo-tRNA (Ryc. 6, panel prawy) [5]. Należy podkreślić, iż udział rRNA w tym procesie polega jedynie na formowaniu właściwej przestrzeni, w obrębie której zachodzi reakcja, zaś samo rRNA nie



bierze bezpośrednio udział w katalizie wiązania peptydowego, a jedynie koordynuje pozycjonowanie dwóch substratów tj. aa-tRNA i peptydylo-tRNA. Zasadniczym elementem biorącym udział w katalizie jest grupa 2'OH adeniny A76, zatem z punktu widzenia typowej katalizy enzymatycznej rybosom nie bierze bezpośredniego udziału w procesie formowania wiązania peptydowego.

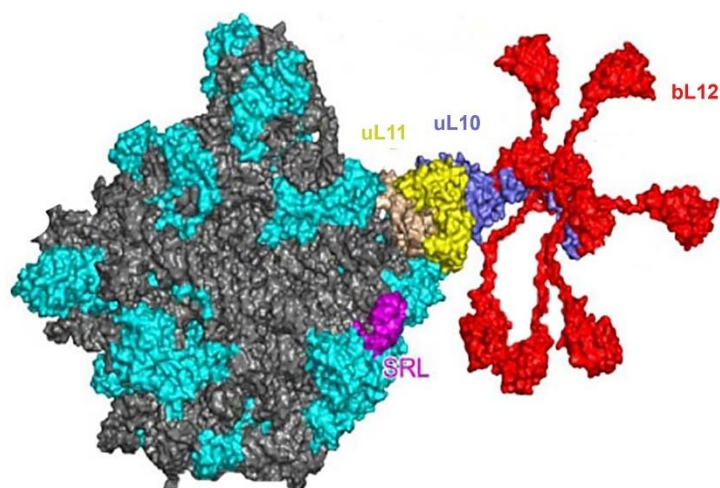


**Ryc. 6. Centrum peptydylotransferazy** [5]. **Panel lewy:** Struktura aa-tRNA oraz peptydylo-tRNA w centrum peptydylotransferazy [29]. Na rysunku zaznaczono substraty: aa - tRNA w miejscu A (kolor różowy) oraz peptydylo-tRNA w miejscu P (kolor zielony). **Panel prawy:** Pozycjonowanie reszty  $\alpha$ -aminowej poprzez interakcję grupy 2'OH (kolor czerwony) adeniny A76 peptydylo-tRNA (kolor zielony) i N3 (kolor granatowy) A2451 (kolor pomarańczowy) [30].

### 2.3 Bakteryjne Centrum GTPazowe

W obrębie dużej podjednostki rybosomalnej zlokalizowane jest trzecie centrum, zwane centrum GTPazowym, tzw. GAC (ang. *GTPase Associated Centre*), (Ryc. 7) [31,32]. Centrum GTPazowe podobnie jak centrum dekodujące jak i peptydylotransferazy, należy do konserwatywnych elementów rybosomu, i występuje na rybosomach u organizmów we wszystkich domenach życia. W obrębie GAC znajduje się także tzw. „miejsce T” na dużej podjednostce i jest miejscem przyłączania się czynników translacyjnych, tzw. translacyjnych GTPaz (trGTPaz). Centrum to jest odpowiedzialne za stymulację trGTPaz do hydrolizy GTP, a uwolniona energia z hydrolizy za pośrednictwem trGTPaz „napędza” rybosom na wszystkich etapach jego funkcjonowania. Działanie centrum GTPazowego, w odróżnieniu od centrum peptydylotransferazy oraz centrum dekodującego, jest efektem współdziałania rRNA i białek rybosomalnych [33]. Elementami rRNA centrum GTPazowego są dwie wysoce konserwatywne domeny w obrębie rRNA od 1070 do 2660

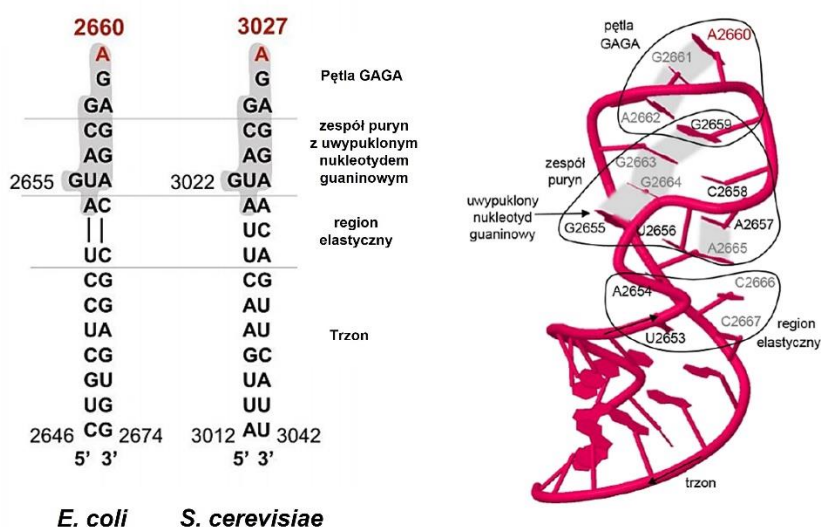
(numeracja właściwa dla *E. coli*); są to: pętla sarcynowo-rycynowa (ang. *Sarcin-Ricin Loop*, SRL) oraz pętla tiostreptonowa (ang. *Thiostrepton Loop*, TL). W skład części białkowej, wchodzi ewolucyjnie konserwowane białko uL10 i uL11 oraz białka: bL12 (bakterie) czy białka P1/P2 (eukarionty) [34–36].



**Ryc. 7. Struktura podjednostki 50S wraz z elementami formującymi centrum GTPazowe [33].** Kolorem turkusowym oznaczono białka dużej podjednostki 50S rybosomu, kolorem szarym rRNA. Białka bocznej wyniosłości, tzw. „kciuka” rybosomalnego zostały zaznaczone następującymi kolorami: kolorem żółtym białko uL11, kolorem fioletowym białko uL10, zaś czerwonym białko bL12. Pętla sarcynowo-rycynowa oznaczona została kolorem różowym.

Nazwa pętli SRL powiązana jest z faktem, że jest ona celem dwóch toksyn: mykotoksyny  $\alpha$ -sarcyny z *Aspergillus giganteus*, która przecina specyficzne wiązanie fosfodiesterowe między resztami G2661-A2662 (numeracja *E. coli*) w SRL [37–40], oraz rycyny, białka występującego w nasionach Rącznika pospolitego (łac. *Ricinus communis*), która prowadzi depurynację zasady adeninowej w obrębie SRL na rRNA, w pozycji A2660 u *E. coli* [41,42]. Pętla SRL znajduje się w VI domenie 23S/25S/28S rRNA i wchodzi w skład helisy 95 (u *E. coli* obejmuje nukleotydy C2646-G2674 w 23S rRNA, u drożdży *S. cerevisiae* nukleotydy A3012-A3042 w 25S/28S) [43]. Pętla SRL ma konformację przypominającą „szpilkę do włosów” (ang. *hairpin*, Ryc. 8) [32]. Pętla SRL składa się z kilku elementów strukturalnych: trzonu, elastycznego regionu, zespołu zasad purynowych stabilizujących strukturę oraz pętli GAGA [44]. Struktura pętli SRL jest formowana głównie przez klasyczne oddziaływania Watson-Crick’a między poszczególnymi parami zasad, ale także jest stabilizowana przez oddziaływania niekowalencyjne między pierścieniami aromatycznymi zasad, tzw.  $\pi$ -stacking interactions [45]. W obrębie pętli GAGA znajduje się reszta adeniny: A2660/A3027 (*E.coli/S.cerevisiae*), która jest w eksponowana i nie

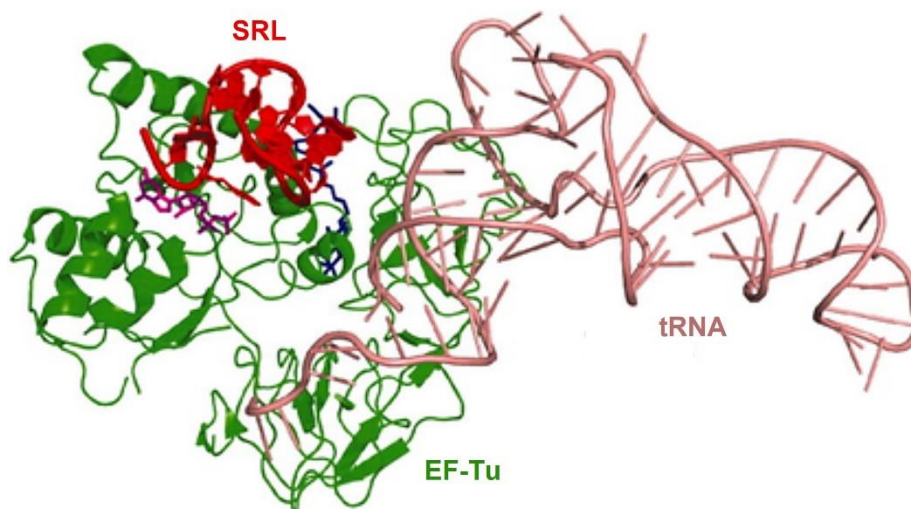
formuje oddziaływań z innymi resztami w obrębie pętli, co czyni ją łatwo dostępnym celem dla zewnętrznych czynników takich jak np. rycyna (Ryc. 8) [46]; depurynacja, czyli usunięcie zasady adeninowej, prowadzi do utraty funkcjonalności pętli SRL w zakresie stymulacji trGTPaz do hydrolizy GTP. Pętla SRL wykazuje wysoki stopień konserwatywności wśród wszystkich domen życia [22,47]. Porównując do domen *Bacteria*, *Archea* i *Eucaryota*, fragment ten różni się w przypadku domeny *Bacteria* jednym nukleotydem, stąd też o pełnej konserwatywności mówi się w odniesieniu do sekwencji 12-nukleotydowej (AGUACGAGAGGA), (Ryc. 8, panel lewy) [48].



**Ryc. 8. Model struktury pętli sarcynowo-rycynowej. Panel lewy:** porównanie wysoko konserwatywnej struktury drugorzędowej pętli SRL u bakterii i drożdży. Czerwonym kolorem wskazano kluczową adeninę, która ulega depurynacji przez rycynę. **Panel prawy:** struktura pętli sarcynowo-rycynowej *Escherichia coli* (PDB 480D) opracowana z wykorzystaniem programu Jmol [49]. Czarną linią zaznaczono poszczególne elementy strukturalne pętli (pętla GAGA, zespół puryn z uwypukloną guaniną oraz region elastyczny). Szare pola oznaczają oddziaływania pomiędzy poszczególnymi zasadami azotowymi na zasadzie  $\pi$ -stacking interactions.

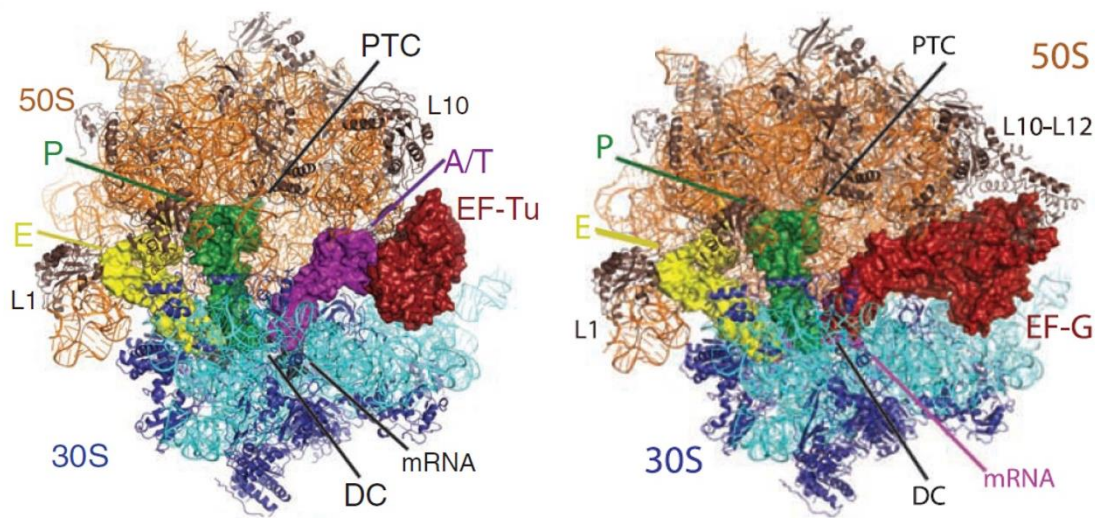
Pętla sarcynowo-rycynowa jest kluczowym elementem w centrum GTPazowego i będąc wyeksponowana na powierzchni rybosomu wchodzi w bezpośredni kontakt z trGTPazami, jak pokazały analizy strukturalne z wykorzystaniem modelu bakteryjnego. Wierzchołek pętli SRL, pętla GAGA, jest elementem bezpośrednio ulegającym interakcji z domeną GTPazową trGTPaz [32], zaś analizy biochemiczne potwierdziły kluczową rolę pętli w stymulacji trGTPaz do hydrolizy GTP (Ryc. 9) [50].





**Ryc. 9. Interakcja SRL z kompleksem trójskładnikowym TC [51].** Kolorem czerwonym zaznaczono pętlę sarcynowo-rycynową SRL, kolorem zielonym czynnik EF-Tu, GDP zaznaczono kolorem fioletowym w formie struktury chemicznej, zaś tRNA kolorem bladuróżowym. Kolorem różowym zaznaczono antybiotyk kirromycynę przedstawioną podobnie jak GDP w postaci struktury chemicznej.

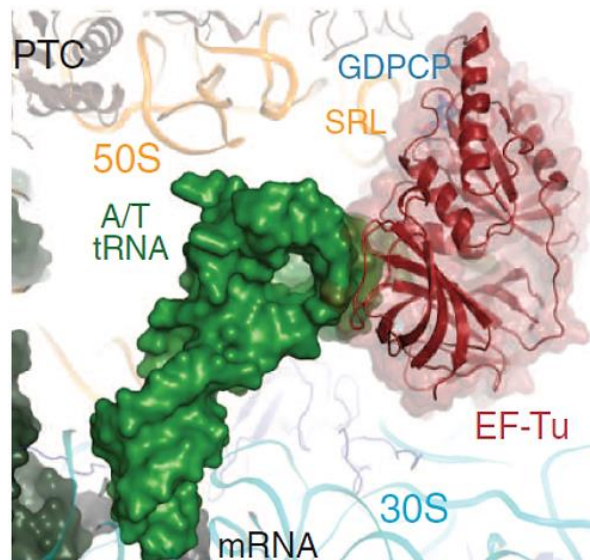
Należy podkreślić, że struktura domeny wiążącej i hydrolizującej GTP wszystkich trGTPaz jest konserwowana ewolucyjnie [52], a podobieństwo strukturalne i funkcjonalne pokazuje, że trGTPazy posiadają wspólny mechanizm działania niezależnie od pochodzenia organizmu. Działanie trGTPazy opisano na przykładzie bakteryjnych trGTPaz EF-Tu i EF G. Czynniki te ulegają interakcji z centrum GTPazowym i stanowią kluczowe elementy w procesie dekodowania jak i translokacji w cyklu elongacyjnym (Ryc. 10, 11).



**Ryc. 10. Oddziaływanie rybosomu prokariotycznego z czynnikami translacyjnymi [5,53]. Panel lewy:** struktura 70S w kompleksie z EF-Tu wraz z aa-tRNA **Panel prawy:** struktura 70S wraz z czynnikiem EF-G. Kolorem błękitnym przedstawiono małą podjednostkę rybosomalną (30S), kolorem pomarańczowym dużą podjednostkę (50S). Oba czynniki translacyjne oznaczono kolorem bordowym. Na rysunku zaznaczono także: kolorem żółtym tRNA w miejscu E rybosomu, kolorem zielonym tRNA w miejscu P, kolorem fioletowym aa-tRNA w kompleksie z EF-Tu. PTC - centrum peptydylotransferazy (ang. *peptidyl transferase center*); DC – centrum dekodujące (ang. *decoding center*); L1–boczna wyniosłość na dużej podjednostce rybosomalnej.

## 2.4 Cykl elongacyjny

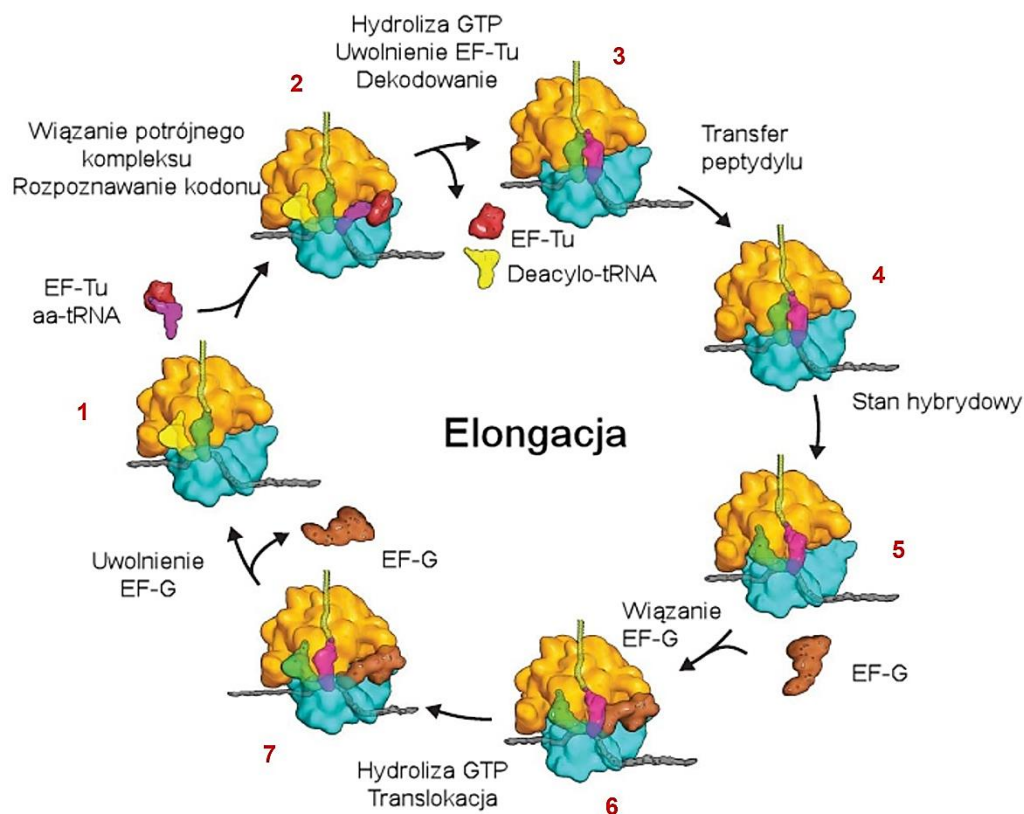
Zasadniczym elementem w procesie biosyntezy białka jest cykl elongacyjny, w którym to zachodzi synteza polipeptydu na bazie informacji w mRNA. Cykl ten składa się z dwóch zasadniczych etapów; dekodowania i translokacji (Ryc. 12). Etap dekodowania to moment, w którym substrat tj. aa-tRNA jest dostarczany do miejsca A rybosomu w formie trójskładnikowego kompleksu (ang. *ternary complex*, TC) aa-tRNA-EF-Tu wraz z GTP (Ryc. 11).



**Ryc. 11. Kompleks trójściłnikowy związany z rybosomem [54].** Model strukturalny przedstawiający interakcję pętli sarcynowo-rycynowej z potrójnym kompleksem TC: aminoacylo-tRNA (aatRNA), czynnikiem elongacyjnym EF-Tu stabilizowanym analogiem GTP (ang.  *$\beta$ - $\gamma$ -metyleneguanosine 5'triphosphate*, GDPCP). Czerwonym kolorem zaznaczono czynnik EF-Tu, kolorem zielonym aa-tRNA przyłączony do rybosomu zaś kolorem niebieskim GDPCP. Na żółto została zaznaczona pętla sarcynowo-rycynowa.

W stanie podstawowym, na początku cyklu elongacyjnego, w miejscu P rybosomu znajduje się peptydylo-tRNA, a miejsce A jest wolne. Na etapie dekodowania, aa-tRNA zajmuje miejsce A w formie TC, a selekcja TC odbywa się na bazie informacji genetycznej zapisanej w mRNA. Na tym etapie rybosom dokonuje sprawdzenia poprawności aa-tRNA dostarczanego w formie kompleksu TC do miejsca A, w obrębie centrum dekodującego. Związanie właściwego kompleksu TC do miejsca A na rybosomie prowadzi do serii zmian konformacyjnych w TC, a przede wszystkim w domenie GTPazowej czynnika EF-Tu, które prowadzą do indukcji hydrolizy GTP, w której to pętla SRL gra kluczową rolę. Po hydrolizie GTP przez EF-Tu, uwolniona energia prowadzi do zmian konformacyjnych EF-Tu, co skutkuje uwolnieniem czynnika z rybosomu i pozostawieniem właściwego aa-tRNA w miejscu A. Na drodze spontanicznych zmian strukturalnych następuje przesunięcie ramienia akceptorowego tRNA z miejsca A do PTC. Etap ten jest nazywany akomodacją aa-tRNA. Hydroliza GTP, uwolnienie EF-Tu, powodujące akomodację aa-tRNA w miejscu A, prowadzi do wprowadzenia aminokwasu do centrum PTC, gdzie zachodzi reakcja syntezy wiązania peptydowego w obrębie peptydylo-tRNA związanego z miejscem P. W wyniku tego, powstaje deacylowany tRNA w miejscu P, zaś miejsce A zawiera peptydylo-tRNA, którego polipeptyd został wydłużony o jedną resztę aminokwasową. Synteza wiązania peptydowego i przejście peptydylo-tRNA z miejsca P do miejsca A

otwiera kolejny etap w elongacji, tj. proces translokacji, w którym peptydylo-tRNA i mRNA przesuują się o jeden kodon w stosunku do rybosomu. Translokacja jest katalizowana przez czynnik elongacyjny EF-G (u bakterii), który posiada powinowactwo do rybosomu w tzw. fazie pre-translokacyjnej, z miejscem A zajęтым przez peptydylo-tRNA i wolnym tRNA w miejscu P. Przyłączenie EF-G do rybosomu prowadzi do zmian konformacyjnych w obrębie EF-G, który będąc trGTPazą hydrolizuje GTP (z kluczowym udziałem pętli SRL). Proces ten uruchamia właściwą translokację, podczas której peptydylo-tRNA i deacylowane tRNA przemieszczają się odpowiednio do miejsc P i E; nowy kodon jest eksponowany w miejscu A, co umożliwia przyłączenie następnego aa-tRNA w formie TC, a deacylowane tRNA jest uwalniane z miejsca E (Ryc. 12) [5,55].

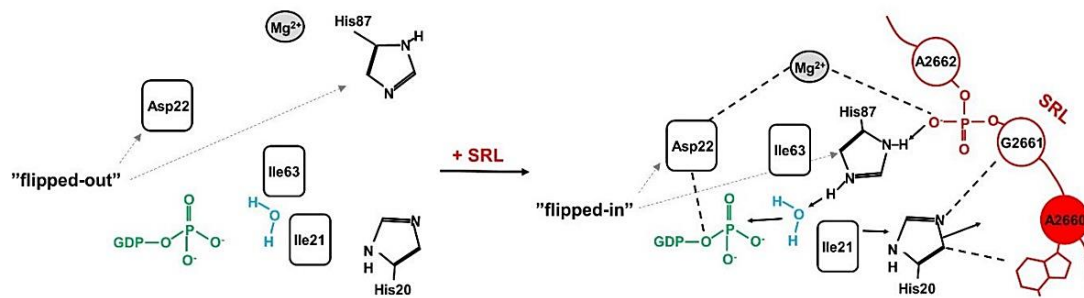


**Ryc. 12. Cykl elongacji w procesie translacji [5].** Podjednostki rybosomu zaznaczono odpowiednio: kolorem turkusowym podjednostka 30S, kolorem pomarańczowym podjednostka 50S. Miejsca A, P i E zaznaczono odpowiednio kolorami: fioletowym, zielonym i żółtym. Czynniki elongacyjne EF-Tu jest zaznaczony kolorem czerwony, czynnik elongacyjny EF-G kolorem brązowym, mRNA jest kolorem szarym, a rosnący łańcuch polipeptydowy kolorem jasnozielonym. Kolejne etapy cyklu elongacyjnego oznaczono cyframi: 1 - stan podstawowy, w miejscu P znajduje się peptydylo-tRNA, miejsce A jest wolne, 2 - rekrutacja kompleksu TC do miejsca A i dekodowanie informacji genetycznej, 3 - hydroliza GTP i akomodacja aa-tRNA (przesunięcie ramienia akceptorowego tRNA z miejsca A do PTC); 4 - syntezy wiązania peptydowego w obrębie peptydylo-tRNA związanego z miejscem P; 5 - peptydylo-tRNA i mRNA przesuwają się o jeden kodon w stosunku do rybosomu (pretranslokacja); 6 - wiązanie czynnika elongacyjnego EF-G i właściwa translokacja, podczas której peptydylo-tRNA i deacylowane tRNA przemieszczają się odpowiednio do miejsc P i E; 7 - uwolnienie czynnika EF-G, deacylowane tRNA jest uwalniane z miejsca E, nowy kodon jest eksponowany w miejscu A, co umożliwia przyłączenie następnego aa-tRNA w formie TC - rybosom osiąga stan podstawowy pozwalającego na inicjację następnego cyklu elongacyjnego.

Wszystkie trGTPazy oddziałują z pętlą sarcynowo-rycynową poprzez domenę wiążącą GTP, tzw. domenę G, zawierającą miejsce wiązania GTP odpowiedzialne za hydrolizę GTP [56]. Struktura domeny G jest ewolucyjnie konserwatywna wśród wszystkich trGTPaz [57]. Proces hydrolizy GTP katalizowany przez trGTPazy, przy aktywnym udziale rybosomu, jest źródłem energii niezbędnej do biosyntezy białka, a przede wszystkim do indukcji zmian strukturalnych w obrębie trGTPaz co „napędza” rybosom na poszczególnych etapach biosyntezy białka. Kluczową rolę podczas katalizy hydrolizy GTP odgrywa reszta

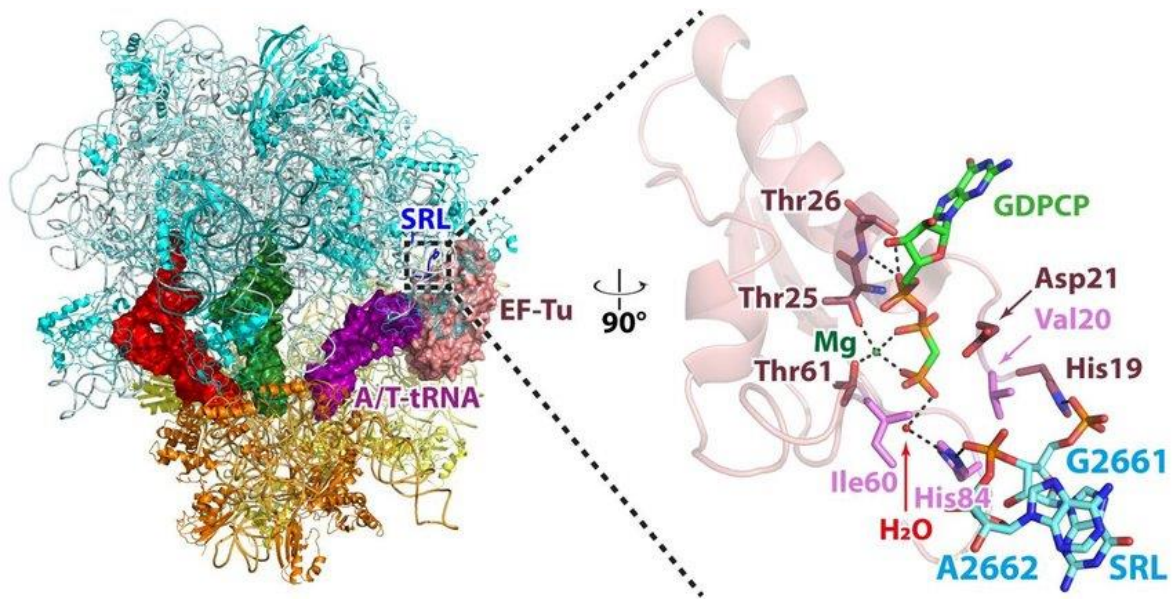
histrydynowa w domenie GTPazowej (His84 w EF-Tu, His87 w EF-G, His61 w SelB oraz His108 w eEF2) [50,57–60]. Reszta ta może przyjąć dwie konformacje strukturalne: nieaktywną - stan, w którym jest ona oddalona (ang. „*flipped out*”) od grupy fosforanowej  $\gamma$  w GTP oraz aktywną, kiedy to reszta ta jest skierowana do  $\gamma$ -fosforanu (pozycja „*flipped in*”) (Ryc. 13) [59,61]. Po przyłączeniu się trGTPazy do rybosomu, trGTPaza zajmuje pozycję, w której pętla SRL jest „wstawiana” do centrum katalitycznego domeny G, a grupa fosforanowa reszty adeninowej A2662 (numeracja *E. coli*) pętli SRL ukierunkowuje, za pomocą oddziaływań elektrostatycznych, katalityczną histydynę do pozycji stanu aktywnego, w kierunku  $\gamma$ -fosforanu GTP [54,61,62]. Dodatkowo naładowana histydyna oddziałuje z cząsteczką wody doprowadzając do jej aktywacji co w konsekwencji prowadzi do nukleofilowego ataku na  $\gamma$ -fosforan GTP. Dodatkowo grupa fosforanowa reszty A2662 koordynuje wiązanie jonu magnezowego  $Mg^{2+}$ , który pozycjonuje resztę krytycznego dla hydrolizy GTP kwasu asparaginowego w obrębie domeny G trGTPazy (Asp21 w EF-Tu, Asp22 w EF-G, Asp10 w SelB), co z kolei indukuje otwarcie tzw. bramki hydrofobowej zbudowanej z dwóch reszt aminokwasowych Ile63 i Ile21 będące kluczowym elementem do indukcji hydrolizy GTP (Ryc. 13) [50,61]. Na szczególną uwagę zasługuje zasada adeninowa w pozycji 2660, która ulega depurynacji za pośrednictwem rycyny. Zasada ta odgrywa pośrednią rolę w indukcji hydrolizy GTP, ponieważ nie bierze bezpośredniego udziału w indukcji hydrolizy GTP, ale jest kluczowa do stabilizacji zestawu wiązań wodorowych stabilizujących stan aktywny domeny G w obrębie trGTPaz (Ryc. 13 i 14).





**Ryc. 13. Model aktywacji hydrolizy GTP przy udziale pętli SRL na przykładzie oddziaływań z czynnikiem translacyjnym EF-G [63]. Panel lewy:** organizacja miejsca aktywnego czynnika EF-G. Asp22 i His87 w stanie nieaktywnym „odwróconym” - ”flipped out”. Bramki hydrofobowe, formowane przez aminokwasy Ile 63 oraz Ile21 „chronią” His87 przed przyjęciem aktywnej konformacji „flipped in”. **Panel prawy:** reorganizacja miejsca aktywnego EF-G w rezultacie przyłączenia trGTPazy do rybosomu oraz umieszczeniu pętli SRL w miejscu aktywnym domeny G czynnika. Reszta A2660 oddziałuje z histydyną His20, co indukuje przesunięcie reszty Ile 21 i otwarcie „bramek hydrofobowych”. Fosforan reszty A2662 kieruje His87 oraz Asp22 w stronę  $\gamma$ -fosforanu GTP, co pozwala na aktywację cząsteczki wody i jej nukleofilowy atak na  $\gamma$ -fosforan, czego konsekwencją jest hydroliza GTP.

Udział rybosomu w stymulacji hydrolizy GTP jest bezpośredni, jego rola polega na indukowaniu zmian konformacyjnych w centrum katalitycznym trGTPaz, a rybosomalne centrum GTPazowe z pętlą SRL stanowi kluczowy element (Ryc. 14).

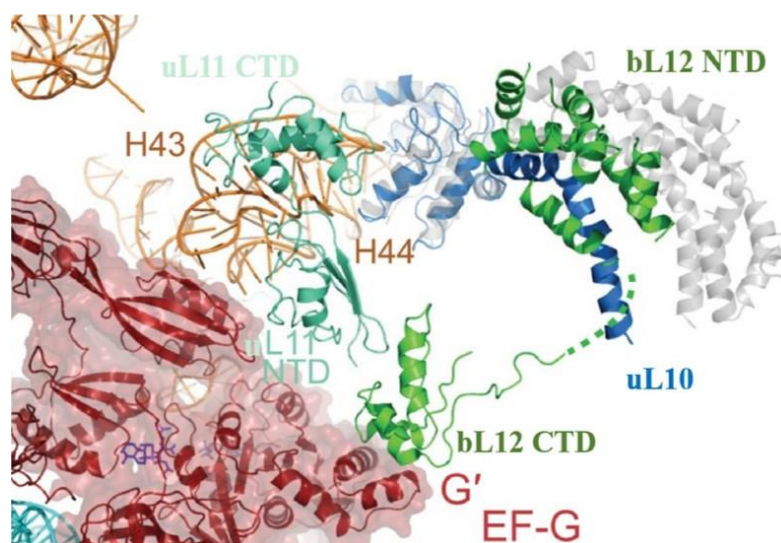


**Ryc. 14. Model strukturalny rybosomu prokariotycznego w kompleksie z czynnikiem translacyjnym EF-Tu [64].** Panel lewy: rybosom 70S wraz z TC. Panel prawy: obszar wiązania GTP w domenie G czynnika EF-Tu (kolor jasno-czerwony) z analogiem GTP (GDPCP) - kolor zielono-brązowy; struktura SRL została oznaczona kolorem niebieskim; wiązania wodorowe są przedstawione liniami przerywanymi; jon magnezowy, przedstawiony w postaci zielonego punktu, koordynuje tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy resztami Thr25, Thr61 oraz  $\beta$ - i  $\gamma$ -fosforanem GTP; elementy hydrofobowe łańcuchów Val20 oraz Ile60 są w pozycji otwartej; orientacja reszty His19, sąsiadująca z resztą Val20, jest stabilizowana za pomocą wiązania wodorowego z nukleotydem G2661 23S rRNA pętli SRL; zasada A2662 stabilizuje konformację aktywną reszty His84, która aktywuje molekulę wody (przedstawioną na rysunku za pomocą czerwonego punktu) [54].

Element białkowy centrum GTPazowego to rybosomalne białka uL11 i uL10 wraz z dimerami białek bL12 (bakterie) czy P1/P2 (eukarionty), które tworzą strukturalnie odrębną jednostkę - boczną wyniosłość rybosomalną, tzw. „kciuk” rybosomalny [65]. „Kciuk” rybosomalny jest oligomeryczną strukturą połączoną z rybosomem przez konserwatywny region rRNA, pętlę tiostreptonową, za pośrednictwem białka uL10 (Ryc. 7) [66,67]. Wspólnym, funkcjonalnym „mianownikiem” bocznej wyniosłości rybosomalnej, dla wszystkich domen życia, jest rekrutacja trGTPaz i stymulacja zależnego od czynników translacyjnych procesu hydrolizy GTP podczas translacji, w jednoczesnej współpracy z SRL [68]. Unikalną cechą tego elementu rybosomalnego jest to, że jego aktywność zależy głównie od białek rybosomalnych, w przeciwieństwie do innych procesów zachodzących w obrębie rybosomu, które są rRNA-zależne, jak na przykład działanie SRL w obrębie centrum, czy proces dekodowania [69]. W skład tej struktury wchodzi dwie, odrębne funkcjonalnie i ewolucyjnie, składowe: podstawa „kciuka” oraz część boczna. Pierwsza, u przedstawicieli wszystkich domen życia, jest reprezentowana przez dwa konserwatywne

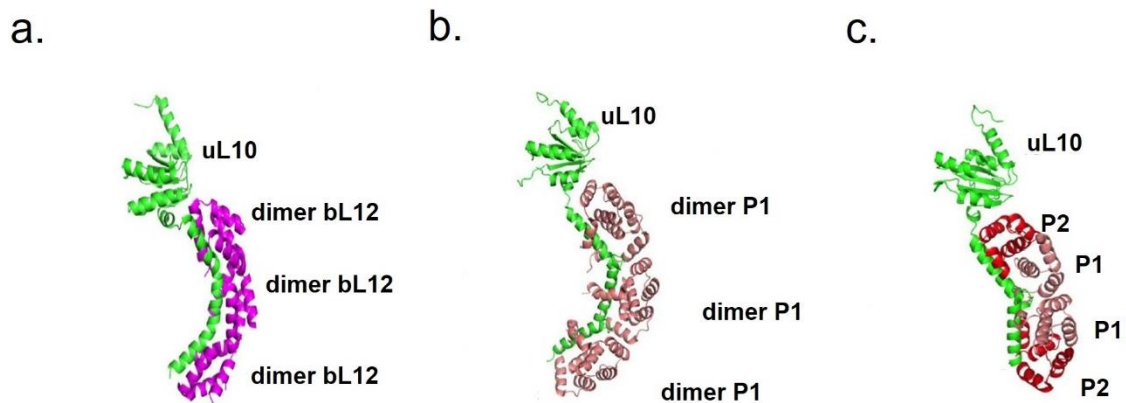


białka: uL11 oraz uL10. Białko uL11 jest przyłączone do głównego korpusu dużej podjednostki rybosomalnej za pośrednictwem helisy 43/44 rRNA (Ryc. 15) [70,71]. Rybosomalne białko uL10 (dawniej znane jako L10 u bakterii czy P0 u archeonów i eukariontów), sąsiaduje z białkiem uL11 i jest elementem kotwiczącym białka „kciuka” do rybosomu. Białko to wiąże się za pomocą domeny N-końcowej, homologicznej wśród wszystkich trzech domen życia, do elementu rRNA. Domena C-końcowa różni się strukturalnie między bakteriami a archeonami/eukariontami, natomiast pod względem pełnionych funkcji (wiązania kopii białek bL12 u bakterii, P1 u archeonów i P1/P2 u eukariontów), możemy ją zaklasyfikować do struktur analogicznych.



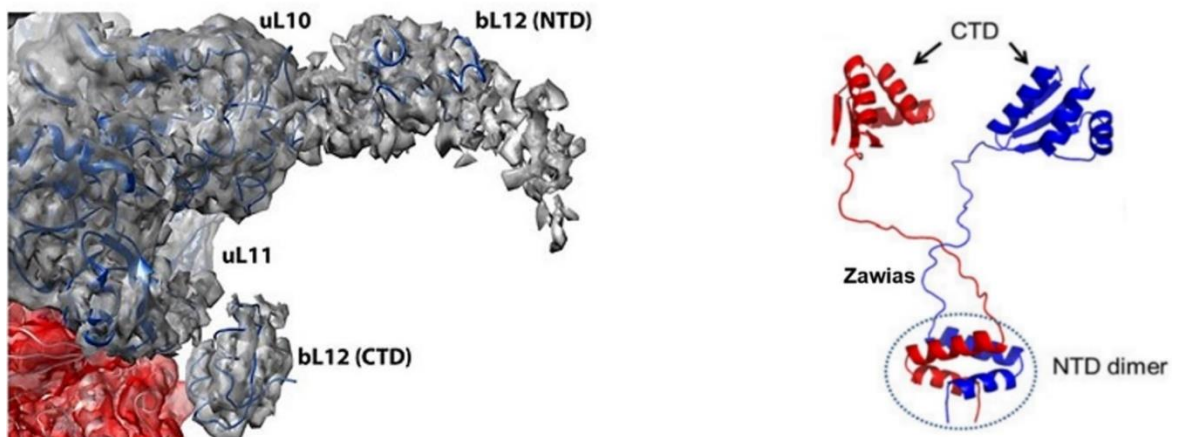
**Ryc. 15. Oddziaływanie czynnika EF-G z centrum GTPazowym z uwzględnieniem białek uL11, uL10 i bL12 oraz rRNA [53].** Model strukturalny przedstawiający oddziaływanie domeny G czynnika EF - G z fragmentem domeny N-terminalnej białka uL11. Kolorem niebieskim zaznaczono białko uL10, kolorem jasnozielonym - uL11, ciemno-zielonym białka bL12 oraz jego domeny N- i C-terminalne, natomiast pomarańczowym helisy 43/44 rRNA.

Zasadnicza część funkcjonalna „kciuka” to oligomeryczny kompleks białkowy o składzie zależnym od pozycji taksonomicznej organizmu. U prokariotów kompleks ten występuje w dwóch konfiguracjach strukturalnych: kompleks pentameryczny uL10-(bL12-bL12)<sub>2</sub> z dwoma dimerami białka bL12, występuje u mezofili, podczas gdy dla termofili odnotowano organizację heptameryczną uL10-(bL12-bL12)<sub>3</sub> z trimerem bL12 (Ryc. 16 a) [71,72]. W przypadku rybosomów archeonów/eukariontów organizacja strukturalna kciuka eukariotycznego to: penta - (uL10-(P1-P2)<sub>2</sub> u eukariontów) z dwoma hetero-dimerami P1-P2 lub heptameryczna (uL10-(P1-P2)<sub>3</sub> z trzema homo-dimerami P1-P2 - domena *Archea*), (Ryc. 16 b-c) [73,74].



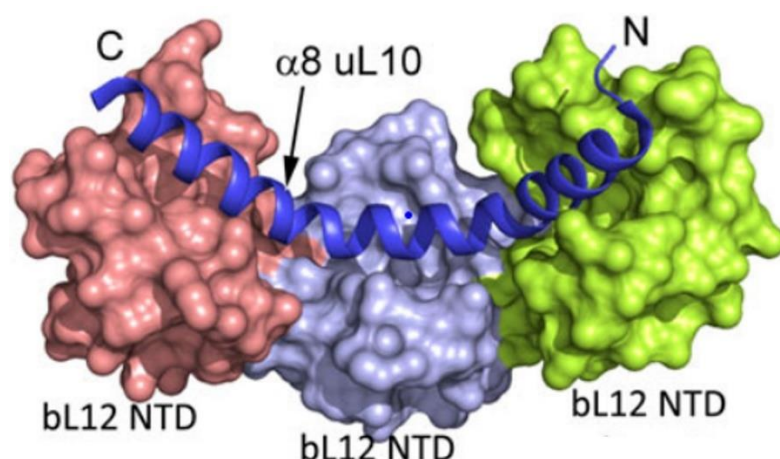
**Ryc. 16. Strukturalna organizacja „kciuka” rybosomalnego u bakterii, archeonów eukariontów uzyskana metodą krystalograficzną [75,76]. a.** bakteryjny model struktury kompleksu białek „kciuka” rybosomalnego składający się z białka uL10 (kolor zielony) i 3 kopii dimerów białka bL12 (kolor fioletowy), o konfiguracji uL10-(bL12-bL12)<sub>3</sub> – widoczne są tylko domeny N-terminalne białek bL12, domena C-terminalna jest niewidoczna z racji na wysoką mobilność, co uniemożliwia określenie struktury 3D **b.** model struktury kompleksu białek u archeonów, składający się z białka uL10 (kolor zielony) oraz trzech kopii homo-dimerów białka P1 (kolor łososiowy), o konfiguracji uL10-(P1-P2)<sub>3</sub>, **c.** model struktury kompleksu białek u eukariontów, składający się z białka uL10 oraz dwóch kopii hetero-dimerów białek P1 (kolor łososiowy) i P2 (kolor czerwony), o konfiguracji uL10-(P1-P2)<sub>2</sub>.

Badania strukturalne wykorzystujące techniki takie jak mikroskopia krio-elektronowa, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego w połączeniu z krystalografią oraz badania biochemiczne wykazały, iż białko bL12 tworzy wydłużoną strukturę w obrębie centrum GTPazowego (Ryc. 17, lewy panel). Analiza NMR pokazała, że białko to zbudowane jest z dwóch domen: domena N-końcowej (ang. *N-terminal domain*, NTD) oraz domeny C-końcowej (ang. *C-terminal domain*, CTD), które są połączone ze sobą wysoce elastycznym elementem łącznikowym, tzw. zawiasem (Ryc. 17, prawy panel).



**Ryc. 17. Model struktury centrum GTPazowego wraz z modelem strukturalnym białka bL12.** **Panel lewy:** fragment struktury rybosomu bakteryjnego – centrum GTPazowe; kolorem szarym zaznaczono obszar odpowiadający białkom uL10 i uL11 oraz części białka bL12. Poszczególne białka zostały podpisane, z wyszczególnieniem domen NTD i CTD białka bL12 [77]. **Panel prawy:** struktura białka bL12 określona metodą NMR, z zobrazowaniem poszczególnych elementów strukturalnych: domeny CTD, zawiasu (łącznika) oraz domeny NTD w formie dimeru [77].

Domena NTD wiąże białko bL12 na uL10 poprzez interakcję z C-kończową helisą białka uL10 (Ryc. 18), zaś domena CTD jest elementem funkcjonalnym białka bL12 i ulega interakcji z trGTPazami (Ryc. 15.). Warunkiem aktywności białka bL12 jest elastyczny łącznik między CTD i NTD, nadający CTD wysoką dynamikę w stosunku do rybosomu (Ryc. 17), [78,79].



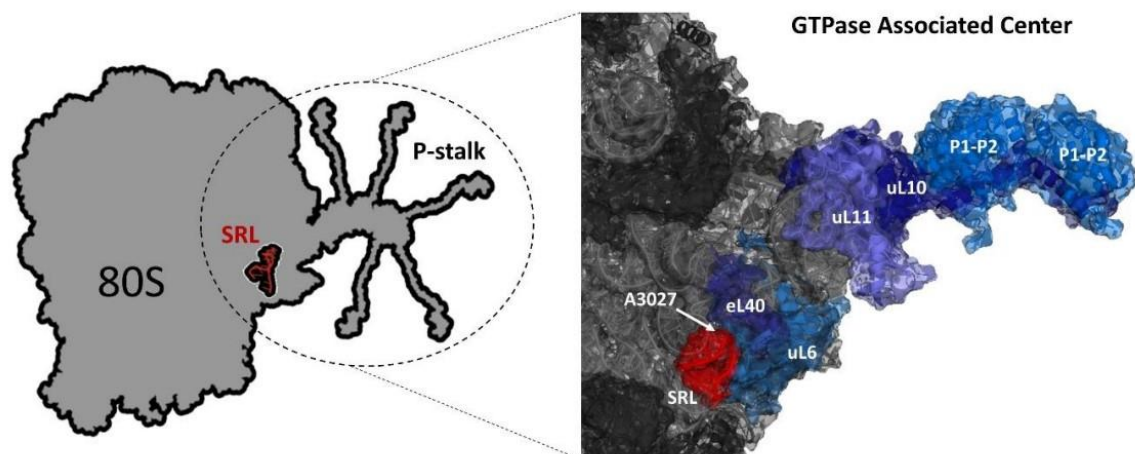
**Ryc. 18. Struktura trzech N-końcowych domen dimerów bL12 przyłączonych do helisy  $\alpha 8$  białka uL10 [77].** Kolorami łososiowym, fioletowym i zielonym zaznaczono poszczególne N-końcowe domeny dimerów białka bL12 (odpowiednio: dimer 1, dimer 2, dimer 3). Kolorem granatowym oznaczono  $\alpha$ -helisę białka uL10 ze wskazanymi N- i C-końcami.

Bakteryjna domena NTD białka bL12 jest zbudowana z 35 aminokwasów, które formują dwie  $\alpha$ -helisy:  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  [80,81]. Helisy te tworzą strukturę haka i ulegając interakcji z homologicznym elementem drugiego białka bL12 w celu utworzenia homo-dimeru białka (bL12)<sub>2</sub>, kotwiczącego na  $\alpha$ -helisie białka uL10 (Ryc. 18) [82–84]. Helisa ta posiada krótkie segmenty aminokwasowe które powtarzają się dwu- lub trzykrotnie, a każdy z nich wiąże dimer białka bL12 [80,85].

Domena CTD, obejmująca u *E. coli* reszty aminokwasowe od 52 do 120 posiada globularną strukturę z dodatnio naładowaną powierzchnią, z którą oddziałują trGTPazy [82,84,86]. Dwie  $\alpha$ -helisy ( $\alpha 4$  i  $\alpha 5$ ) domeny CTD białka bL12 stanowią uniwersalne miejsce interakcji z czynnikami translacyjnymi [87,88]. Domeny NTD i CTD są połączone elastycznym łącznikiem, bogatym w reszty alaninowe i glicynowe, obejmującym reszty 36-51. Jego długość i skład różni się znacząco wśród różnych organizmów [82,89,90]. Z badań metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR) wynika, że element ten posiada zmienną konformację i może formować zwartą formę  $\alpha$ -helisy lub wydłużony nieustrukturalizowany element [82].

## 2.5 Eukariotyczne centrum GTPazowe

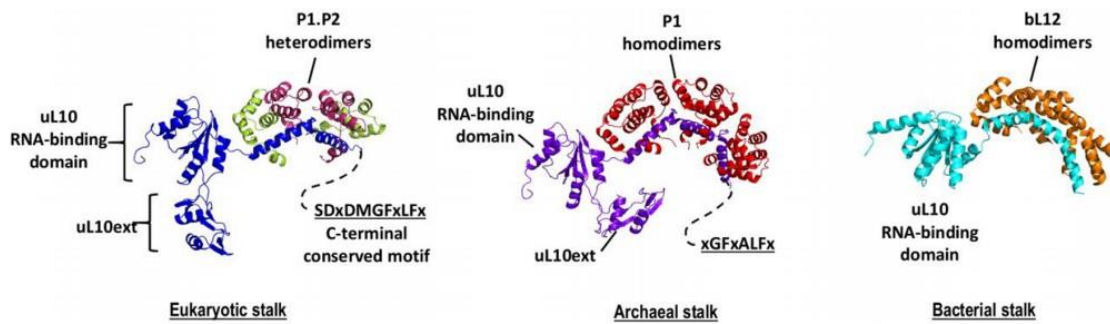
Funkcjonowanie centrum GTPazowego, tak jak pozostałe aspekty procesu translacji, zostało opisane na modelu prokariotycznym, ale z uwagi na wysoki stopień podobieństwa ewolucyjnego, działanie centrum jest podobne na rybosomie eukariotycznym, jednakże ze specyficznymi modyfikacjami [7,8,75,76,91].



**Ryc. 19. Eukariotyczne centrum GTPazowe** [63]. **Panel lewy:** schemat rybosomu eukariotycznego 80S z zaznaczonymi elementem bocznej wyniosłości zwanym 'kciukiem' rybosomalnym. Zobrazowane zostały wydłużone C - końce białek P, kolorem czerwonym zaznaczono pętlę sarcynowo-rycynową. **Panel prawy** przedstawia „kciuk” rybosomalny z zaznaczonymi poszczególnymi elementami; kolor czerwony - pętla SRL, strzałka wskazuje kluczową adeninę A3027, która ulega depurynacji przez białka RIP; odcieniami koloru niebieskiego zaznaczono poszczególne białka wchodzące w skład centrum: białko uL11 - kolor fioletowy, uL10 - kolor granatowy, hetero-dimery białek P1-P2 - kolor jasnoniebieski [91].

Podobnie jak w przypadku prokariotycznego centrum GTPazowego, centrum eukariotyczne jest zbudowane z szeregu białek rybosomalnych, takich jak: konserwatywne białka uL11 i uL10 oraz unikalne dla eukariontów białka P1 i P2 (Ryc. 19). Białka te formują boczną wyniosłość, zwaną „kciukiem” rybosomalnym zakotwiczoną na podjednostce 60S [66]. Podstawę „kciuka” tworzą dwa białka uL11 oraz uL10, które łączą się z białkami P1 i P2. uL10 stanowi zasadniczy trzon bocznej wyniosłości i posiada dwie niezależne domeny (Ryc. 20). Pierwsza, domena N-terminalna wiążąca rRNA, jest homologiczna do bakteryjnego odpowiednika [14]; ponadto posiada unikalną domenę II (tzw. uL10ext), która występuje tylko u Eucaryota oraz domenę C-terminalną będącą pojedynczą  $\alpha$ -helisą, na której związane są białka P1 i P2. W zależności od organizmu,  $\alpha$ -helisa może składać się z dwóch bądź trzech 10-aminokwasowych odcinków, wiążąc dwa (tak jak u Eukaryota) lub trzy dimery białek P1/P2 – jak w przypadku domeny Archaeae (Ryc. 20) [92].

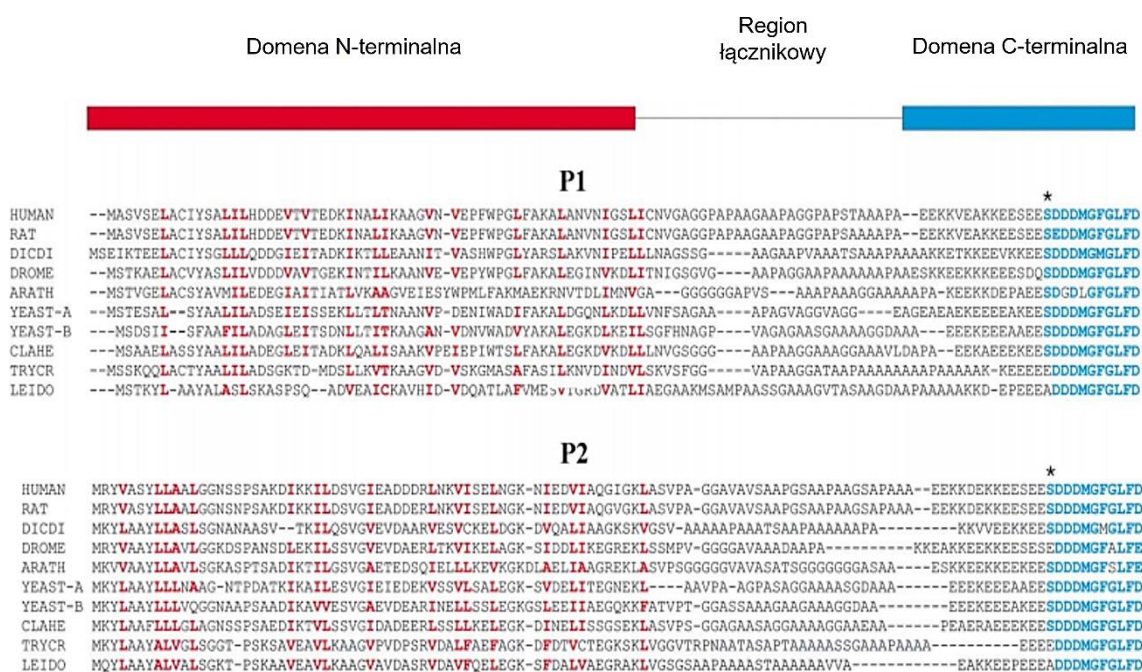




**Ryc. 20. Organizacja strukturalna białka uL10 w obrębie trzech domen życia [76].** Panel lewy: kolorem granatowym zaznaczono białko uL10 z wyszczególnieniem domeny wiążącej RNA oraz domeny uL10ext; kolorem zielonym i różowym oznaczono hetero-dimery białek P1 i P2; linia przerywana reprezentuje konserwatywny motyw C - końcowy białka uL10 homologiczny do białek P1/P2. Panel środkowy: kolorem fioletowym zaznaczono białko uL10 z wyszczególnieniem domeny wiążącej RNA oraz domeny uL10ext, kolorem czerwonym homo-dimery białka P1; linia przerywana fragment konserwatywnego motywu C-końcowego. Panel prawy: kolorem turkusowym zaznaczono bakterijskie białko uL10 wraz ze wskazaniem domeny wiążącej RNA, natomiast kolorem pomarańczowym homo-dimery białka bL12.

Każda z poszczególnych domen białka uL10 posiada określoną funkcję. Domena N-terminalna kotwiczy „kciuk” na rybosomie poprzez interakcję z rRNA, domena uL10ext ulega interakcji z eukariotycznymi trGTPazami, a jej obecność nadaje specyfikę „kciukowi” w stosunku do eukariotycznych trGTPaz [93]. Jak wykazano w przypadku białek uL10 *Pyrococcus horikoshii* i *Bombyx mori*, usunięcie domeny uL10ext lub wstawienie tej domeny do bakterijskiego uL10 prowadziło do zmiany specyfiki oraz wykorzystywania przez rybosom odpowiednich trGTPazy [94,95]. Wedle ostatnich doniesień, domena ta wchodzi w interakcje z białkiem GCN2 (ang. *general control nonderepressible 2*), które odpowiada za fosforylację eukariotycznego czynnika inicjacyjnego  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), [96]. GCN2 jest kluczowym białkiem regulatorowym w sytuacjach stresu komórkowego, takiego jak głód aminokwasowy [97]. Fakt ten wskazuje, że „kciuk” rybosomalny posiada dodatkowych partnerów, nie tylko związanych z translacją. Domena C-terminalna białka uL10 formująca pojedynczą  $\alpha$ -helisę to unikalny element „kciuka” rybosomalnego w obrębie domeny eukariotycznej i archeonów, która kotwiczy białka P1/P2. Białka te są uważane za analogiczne układy w stosunku do bakterijskich białek bL12, ponieważ funkcjonalnie wykazują podobne działanie, tj. ulegają integracji z trGTPazami, natomiast nie mają względem siebie podobieństwa strukturalnego. Zaproponowano, że ich pojawienie się na rybosomie jest efektem ewolucji konwergentnej [65]. Białka P stanowią unikalny element w grupie białek rybosomalnych, ponieważ w przeciwieństwie do pozostałych białek rybosomalnych, białka te występują w komórce w wielu kopiach [98]. Ponadto, ich

charakterystyczną cechą jest ich punkt izoelektryczny (pI) oscylujący w zakresie niskich wartości pH, rzędu 3-4, stąd też nazywane są one kwaśnymi białkami rybosomalnymi (ang. *acidic ribosomal proteins*), [99,100]. Cecha ta zdecydowanie odróżnia je od pozostałych białek rybosomalnych mających charakter zasadowy [101]. Wyróżnia je także ich posttranslacyjna modyfikacja w postaci fosforylacji w obrębie C-końca i z tego powodu są także określane mianem rybosomalnych białek P (ang. *phosphorylated*) [102]. Na podstawie sekwencji aminokwasowej białka te zaklasyfikowano do dwóch grup (Ryc. 21): P1 oraz P2, za wyjątkiem roślin, w przypadku których występuje dodatkowa grupa – P3 [103–105]. Co ciekawe, u niższych eukariontów istnieje dalsza dywersyfikacja wśród białek P. W przypadku drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, białka P posiadają po dwie izoformy białka P1 i P2 - P1A, P1B, P2A i P2B. Białka P formują heterodimery: P1-P2, a u drożdży *S. cerevisiae* P1A-P2B oraz P1B-P2A. Na rybosomie występują z białkiem uL10 w formie pentameru uL10-(P1-P2)<sub>2</sub>, a u drożdży uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A) [67,106–111]. Masa molekularna białek P wynosi 11 kDa [66,68,98,112]. W strukturze białek P1 oraz P2 możemy wyróżnić układ następujących funkcjonalnych domen: globularnej,  $\alpha$ -helikalnej domeny N-terminalnej - NTD, regionu łącznikowego tzw. „zawiasu”, oraz domeny C-terminalnej – CTD (Ryc. 21).

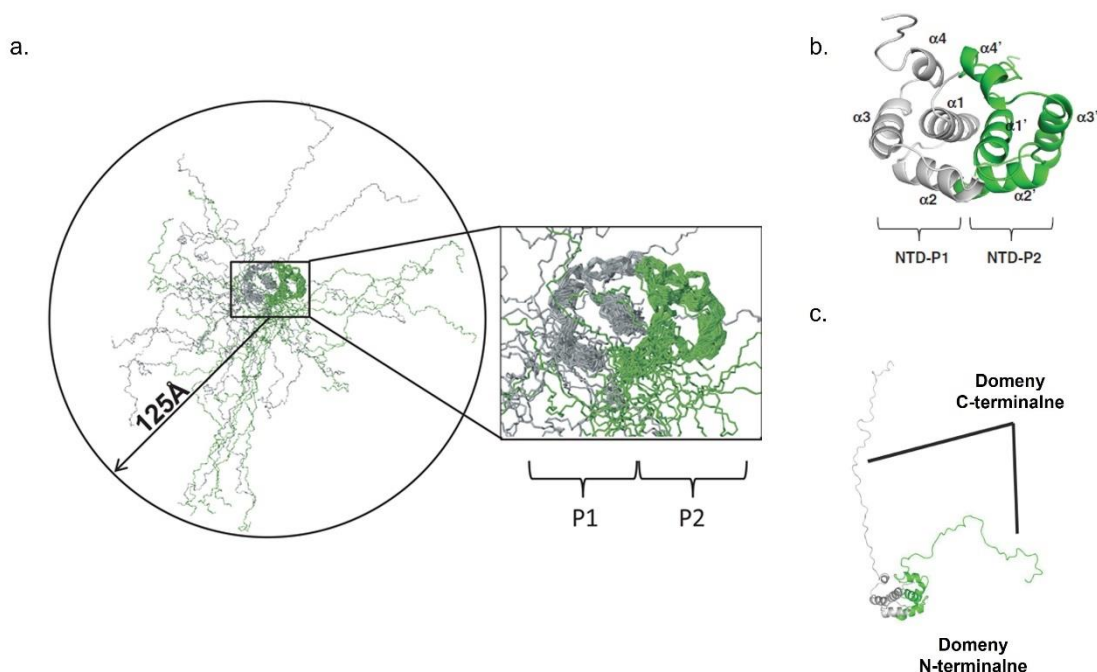


**Ryc. 21. Porównanie sekwencji aminokwasowej kwaśnych rybosomalnych białek P wśród przedstawicieli różnych gatunków [99].** Schemat przedstawia sekwencje białek: ludzkich (HUMAN), szczurzych (RAT), *Dictyostelium discoideum* (DICDI), *Drosophila melanogaster* (DROME), *Arabidopsis thaliana* (ARATH), P1A i P2A *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST - A), P1B i P2B *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST - B), *Cladosporium herbarum* (CLAHE), *Trypanosoma cruzi* (TRYCR) i *Leishmania donovani* (LEIDO). Białka P zostały sklasyfikowane do grup P1 i P2. Czerwoną i pogrubioną czcionką zaznaczono część N-terminalną, zawierającą tzw. zamek hydrofobowy odpowiedzialny za interakcje białko-białko, Kolorem niebieskim oznaczono konserwatywną domenę C-terminalną. Gwiazdką wskazano miejsca fosforylacji.

Domena NTD składa się z około 70 reszt aminokwasowych i jest odpowiedzialna za formowanie się heterodimerów P1-P2 oraz ich kotwiczenie na rybosomie za pośrednictwem białka uL10 (Ryc. 19), [66,113]. Domeny NTD zbudowane są z czterech  $\alpha$ -helis formujących globularną strukturę (Ryc. 22), [114,115]. Region łącznikowy między NTD i CTD to 30-aminokwasowy region bogaty w reszty alaninowe, prolinowe oraz glicynowe, który jest różnorodny pod względem długości oraz sekwencji aminokwasowej, a jego parametry biofizyczne nadają mu wysoką elastyczność strukturalną oraz nie posiada zdefiniowanej struktury [99,103,104]. C-terminalna część to sekwencja około 22 aminokwasów, zdominowana przez reszty aminokwasowe o kwaśnym jak i hydrofobowym charakterze (Ryc. 21). Na szczególną uwagę zasługuje konserwatywna sekwencja około 15 reszt aminokwasowych (EESEESDDDMGFLFD), zawierająca reszty seryny które są fosforylowane przez kinazę białkową CK2 [98,112,116]. Ten C-terminalny element białek P jest częścią funkcjonalną i bierze udział w oddziaływaniach z eukariotycznymi



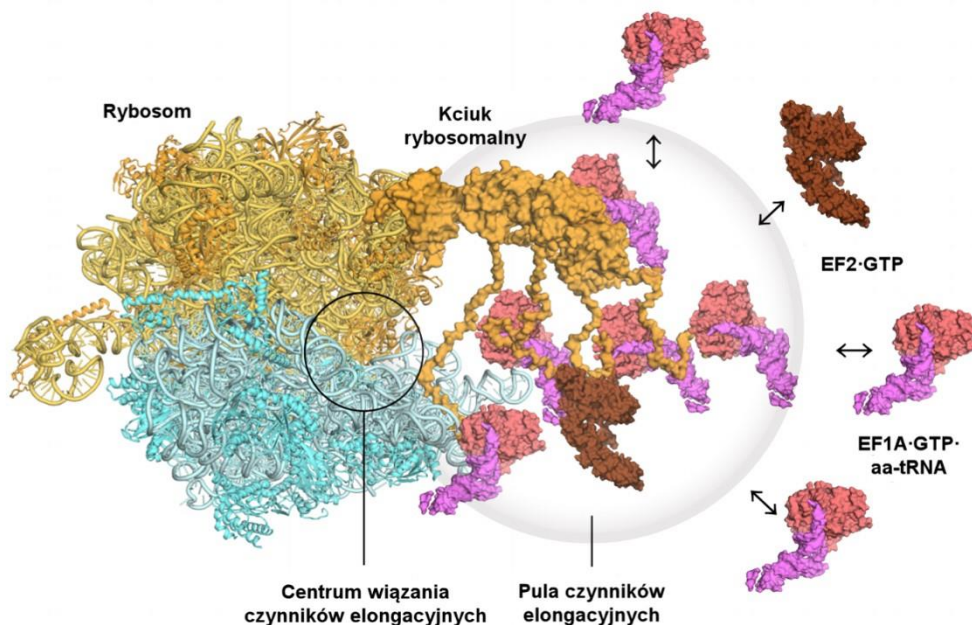
trGTPazami, a jego usunięcie prowadzi do całkowitego ograniczenia aktywności translacyjnej rybosomów [117]. Analizy strukturalne wskazały, że C-terminalny element białek P jest nieustrukturalizowany (Ryc. 22. a i c) i posiada parametry z cechami charakterystycznymi dla struktury konformacyjnej zwanej „molten globule”.



**Ryc. 22. Model struktury heterodimeru P1-P2 opracowany metodą spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) [114]. a.** zestawienie kilkunastu nałożonych na siebie struktur heterodimeru P1-P2 opracowanych metodą NMR; w ramce zaznaczono domenę N-terminalną, zaś w okrąg wzięto pozycję C-terminalnych elementów białek P z poszczególnych dimerów. **b.** struktura domeny NTD (NTD-P1/NTD-P2) z uwzględnieniem czterech  $\alpha$ -helis. **c.** obraz pojedynczego heterodimeru P1-P2 z uwzględnioną domeną NTD oraz nieustrukturalizowanym C-terminalnym elementem.

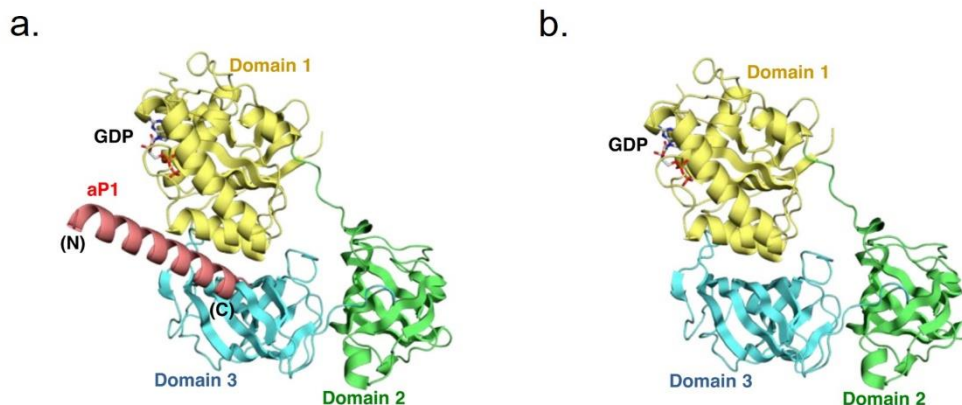
Funkcjonalne aspekty eukariotycznego kompleksu białek „kciuka” rybosomalnego w procesie biosyntezy białek zostały scharakteryzowane na drodze licznych badań biochemicznych [73,118–120]. Badania te wykazały, że eukariotyczny kompleks uL10-(P1-P2)<sub>2</sub> jest odpowiedzialny za tzw. swoistość rybosomalną względem eukariotycznych czynników translacyjnych, a przede wszystkim jest odpowiedzialny za stymulację aktywności GTPazowej trGTPaz, która wspomaga rybosom na wszystkich etapach jego działalności [121]. Najbardziej znaczącym elementem strukturalnym i zarazem funkcjonalnym eukariotycznych białek P jest konserwatywny C-terminalny fragment aminokwasowy, który występuje we wszystkich białkach P włączając także białko uL10. W konsekwencji kompleks „kciuka” zawiera pięć identycznych C-końcowych elementów

pochodzących z białek uL10 i P1/P2 [99]. C-koniec białek P jest odpowiedzialny za rekrutowanie do rybosomu trGTPaz oraz stymulację aktywności GTPazowej trGTPaz (Ryc. 23).



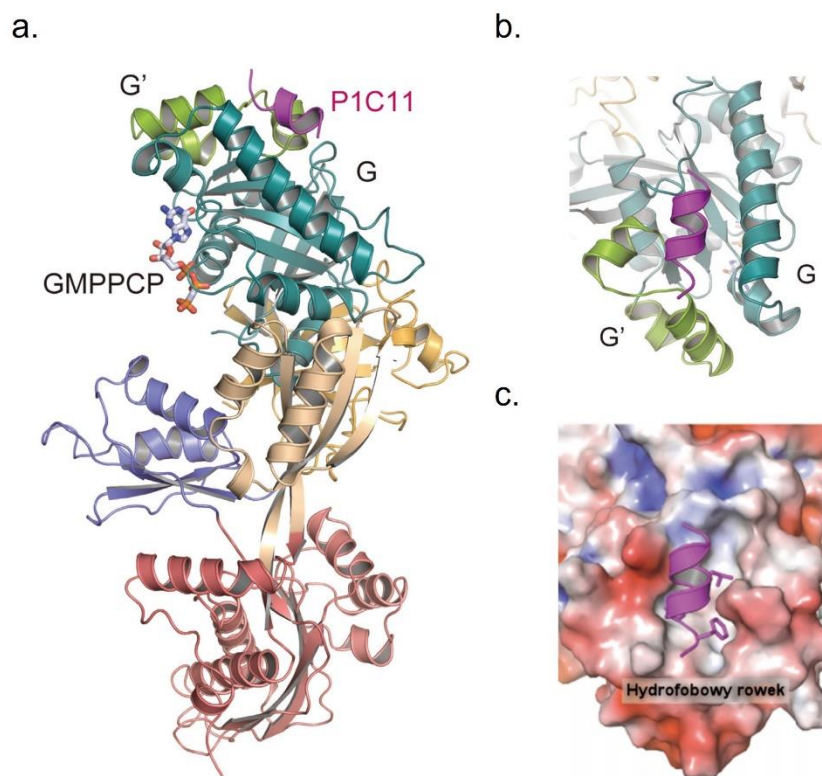
**Ryc. 23. Model rybosomu wraz z czynnikami elongacyjnymi – eEF2 i eEF1A [122].** Czynniki elongacyjne EF1A w kompleksie z GTP i aminocylo-tRNA - kolor różowo oraz łososiowy, czynnik EF2 - kolor brązowy, „kciuk” rybosomalny - kolor pomarańczowy.

Badania strukturalno-biofizyczne kompleksów białkowych, z wykorzystaniem eksperymentalnego modelu opartego na białkach P archeona *Pyrococcus horikoshii* z czynnikami translacyjnymi, wskazały że C-koniec ulega bezpośredniej interakcji z domeną GTPazową trGTPaz [123]. Na podstawie badań, w których wykorzystano białko aEF1 $\alpha$  w kompleksie z fragmentem białka aP1 pokazano, że C-terminalny fragment z białka aP1 wiąże się do aEF1 $\alpha$  do domeny GTPazowej (Ryc. 24). Analizy strukturalne umożliwiły także wgląd w strukturę kompleksu aP1(CTD)-aEF1 $\alpha$ -GDP/GTP na poziomie atomowym, pokazując udział C-końca aP1 w formie pojedynczej  $\alpha$ -helisy w formowaniu kompleksu. Wskazano, że fragment aP1 wiąże się do aEF1 $\alpha$  między domeną 1 a 3 za pomocą rozległej sieci wiązań hydrofobowych oraz wiązań wodorowych, a C-terminalny fragment białka P formuje  $\alpha$ -helisę (Ryc. 24).



**Ryc. 24. Model strukturalny kompleksu aP1(CTD) - aEF1 $\alpha$  - GDP oraz kompleksu aEF1 $\alpha$  - GDP [123]. a.** struktura kompleksu aP1(CTD)-aEF1 $\alpha$ -GDP *P. horikoshii*. aP1(CTD) oraz domeny 1, 2 i 3 aEF1 $\alpha$  są oznaczone odpowiednio kolorem różowym, żółtym, zielonym oraz jasnoniebieskim. Pozycję GDP zaznaczono na czarno. **b.** struktura kompleksu aEF1 $\alpha$ -GDP *P. horikoshii*. Oznaczenia kolorystyczne jak wyżej.

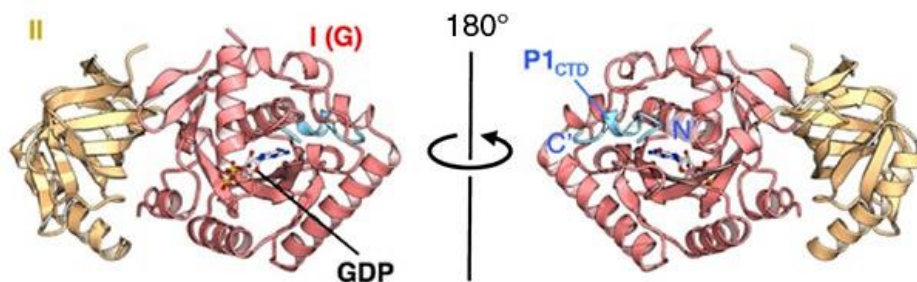
Ponadto, określono także strukturę czynnika EF-2 z *Pyrococcus horikoshii* (*PhoEF-2*) w formach: Apo (wolnej, niezwiązanej z ligandami), związanego z GDP, GMPPCP (niehydrolizowalny analog GTP) i związanego z GMPPCP w kompleksie z fragmentem C-terminalnym białka aP1 - P1C11 z *Pyrococcus horikoshii*. Badania te pozwoliły na opisanie obszaru interakcji między białkiem P a *PhoEF-2*. Struktura kompleksu *PhoEF-2*-GMPPCP-P1C11 pokazała, że P1C11 formuje  $\alpha$ -helisę i wiąże się do *PhoEF-2* między domeną G i subdomeną G' (Ryc. 25). Co ciekawe, obszar wiązania dla C-terminalnego elementu białka P jest całkowicie odmiennym miejscem wiązania niż w przypadku czynnika aEF1 $\alpha$ , w którym to fragment CTD białka P1 wiąże się między domeną G i III czynnika aEF1 $\alpha$ .



**Ryc. 25. Model struktury kompleksu *PhoEF* - 2 - GMPPCP w połączeniu z C-końcowym elementem białka P1 - P1C11 [124].** **a.** struktura kompleksu *PhoEF*-2-GMPPCP-P1C11. Fragment P1C11 formuje  $\alpha$ -helisę - kolor fioletowym, pozostałe domeny eEF2 zaznaczono odpowiednio kolorami. **b.** reprezentacja struktury elementu P1C11 w kompleksie z domeną G/G' czynnika EF2. **c.** model strukturalny z reprezentacją rozkładu ładunku na powierzchni elementu EF2 oddziałującego z P1C11. Pozytywne, negatywne i neutralne potencjały elektrostatyczne na powierzchni zostały przedstawione kolejno kolorami: niebieskim, czerwonym i białym. Reszty aminokwasowe G102, L103, L106 i F107 P1C11, będące krytycznymi dla wiązania *PhoEF*-2 zobrazowano w formie modeli chemicznych.

W ramach analiz strukturalnych opracowano także model 3D opisujący wiązanie C-terminalnego fragmentu białek P do czynnika eIF5B, który należy do trGTPaz. Analizy zostały przeprowadzone na bazie struktury kompleksu IF5B-P1 pochodzącego z archeona *Aeropyrum pernix* (Ryc. 26). W tym celu wykonano analizę strukturalną poprzez krystalizację dwóch składowych: wykorzystano fragment polipeptydu obejmującego domeny I i II czynnika aIF5B (aIF5B<sub>I - II</sub>) oraz syntetyczny peptyd odpowiadający 17 końcowym aminokwasom domeny C-terminalnej białka aP1 (aP1<sub>CTD</sub>). Uzyskana struktura aIF5B związanego z aP1 ujawniła miejsca oraz reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie między aP1 a aIF5B. Są to aminokwasy znajdujące się na C-końcu aP1 oraz w obrębie hydrofobowej kieszeni złożonej z czterech pętli polipeptydowych (Ryc. 26) [125].





**Ryc. 26. Model struktury kompleksu aIF5B<sub>I-II</sub> - GDP - aP1<sub>CTD</sub>** [125]. Domeny I i II aIF5B oznaczono odpowiednio kolorem czerwonym i żółtym, peptyd aP1<sub>CTD</sub> kolorem niebieskim. Pozycja GDP została przedstawiona w postaci struktury chemicznej. Domeny N i C peptydu aP1<sub>CTD</sub> zostały opisane jako N' i C'.

Podsumowując, biorąc pod uwagę analizy strukturalne ukierunkowane na poznanie mechanizmów rządzących oddziaływaniami konserwatywnego odcinek C-końcowego białka aP1 z trGTPazami (aEF2, aEF1 $\alpha$  oraz aIF5B), wykazano iż białka P posiadają unikalne parametry funkcjonalne charakteryzujące się tym, że nie rozpoznają one jednej specyficznej struktury na trGTPazach; element C-terminalny białka P formuje  $\alpha$ -helisę we wszystkich wypadkach, ale co ciekawe posiada potencjał do rozpoznawania wielu partnerów białkowych [124].

## 2.6 Pozarybosomalna aktywność białek P

Poza podstawowym udziałem w procesie translacji białka rybosomalne formujące „kciuk” rybosomalny zostały także powiązane z biologicznymi zjawiskami nie powiązanymi bezpośrednio z procesem biosyntezy białka. Z tego też względu, białka „kciuka” zostały zaliczone do tzw. białek o wielorakiej aktywności, czy też białek o aktywności pozarybosomalnej (ang. *moonlighting proteins*, *extraribosomal function proteins*) [126]. Przykładem takiego białka jest białko uL10; białko to powiązane z procesami naprawy DNA czy z regulacją ekspresji materiału genetycznego na poziomie DNA wskazując na jego aktywność endonukleazy [127–130]. Wykazano także, że w warunkach tzw. stresu jąderkowego, czyli zablokowania syntezy rybosomów, białko uL10 uwalniane jest z rybosomu i akumulowane w cytoplazmie co może mieć istotne konsekwencje funkcjonalne [131]. Wskazano, że białko uL10 może posiadać wielu partnerów białkowych, nie należących do maszyny translacyjnej, np.: białko Staufen1, które bierze udział w transporcie mRNA [132], białko Tau, charakterystyczne dla choroby

Alzheimerera [133], białko KIF4 związane z transportem rybosomów w komórkach nerwowych [134], FMRP będące białkiem lokalizowanym najczęściej w mózgu, a mającym istotne znaczenie dla prawidłowego rozwoju poznawczego [135] czy też białko GCIP, które bierze udział w kontroli różnicowania i proliferacji komórek [136]. Ponadto, białka P zostały opisane jako molekularny czynnik etiologiczny w chorobach autoimmunologicznych – stanowią charakterystyczny autoantygen w chorobie toczenia układowego (*Systemic Lupus Erythematosus*, SLE) [137,138]. Uważa się także, że poziom ekspresji białek P może być jednym z markerów w pewnych podtypach nowotworów [139]. Ponadto stwierdzono pojawienie się przeciwciał skierowanych przeciwko białkom P podczas infekcji pierwotniakami takimi jak *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* czy *Plasmodium falciparum* [140–143]. Zidentyfikowano je również jako jeden z alergenów chorób wywoływanych przez grzyby takie jak *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum*, *Aspergillus fumigatus* czy *Cladosporium herbarum* [144–146].

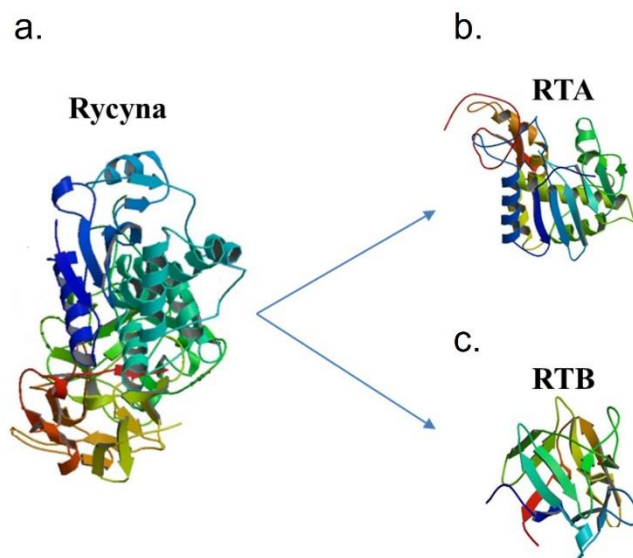
### 3. Białka RIP - Ribosomal Inactivating Proteins

Rybosomalne białka P, oprócz interakcji z trGTPazami, które można uważać za podstawowych partnerów dla tych białek, „partnerują” także innym tzw. poza rybosomalnym białkiem. Jak już wspomniano wcześniej, wykazano, że ulegają interakcji z kinazą GCN2, aktywując ją w warunkach głodu aminokwasowego. Jednakże, istotnym „partnerem” dla białek P jest grupa białek zwanych białkami inaktywującymi rybosom, określanymi także jako białka RIP (ang. *Ribosomal Inactivating Proteins*), [147]. Wskazano, że białka P są ważne jako element wiążący białka RIP do rybosomu, co warunkuje ich aktywność biologiczną w stosunku do eukariotycznego rybosomu, tj. depurynację zasady adeninowej w pętli SRL, a to prowadzi do zahamowania procesu translacji przez rybosom [148].

Białka RIP są klasyfikowane w trzech grupach: jako białka monomeryczne - typ I, białka hetero-dimeryczne - typ II, oraz typ III, klasyfikowany jako specjalna grupa białek RIP, których odrębność polega na tym, że są produkowane jako proenzymy składające się z pojedynczej podjednostki katalitycznej, stając się aktywnymi dopiero po obróbce proteolitycznej. Białka należące do typu I składają się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego i posiadają aktywność konstytutywną; w grupie tej wyróżnia się białka:

PAP (ang. *pokeweed antiviral protein*), trichosantyna, saporyna, gelonina czy luffina. Z kolei do grupy II należą białka: rycyna, abryna czy tzw. toksyna Shiga; w grupie tej enzymatycznie aktywnym białkiem jest podjednostka A zaś druga podjednostka B to polipeptyd połączony mostkiem dwusiarczkowym z łańcuchem A [149]. Do trzeciej grupy białek RIP zaliczane jest białko indukowane jasmonianem metylu (JIP60) oraz białko kukurydzy b-32; białka te do aktywacji wymagają obróbki proteolitycznej [150,151]. W 2010 roku została zaproponowana także nową alternatywna nomenklatura dla białek RIP, w którym określa się je jako A (typ I), AB (typ II), AC (typ III, obejmujące białka podobne do JIP60) i AD (typ III, zrzeszający białka podobne do b32), [152]. Wszystkie białka RIP klasyfikowane są jako toksyny, ponieważ ich działanie na komórkę eukariotyczną jest toksyczne i prowadzi do śmierci komórki. Najbardziej toksycznymi białkami są białka z klasy II, które posiadają podjednostkę B umożliwiającą efektywne wejście do komórki eukariotycznej, na przykład rycyna, która uważana jest za jedno z najbardziej toksycznych białek występujące w przyrodzie.

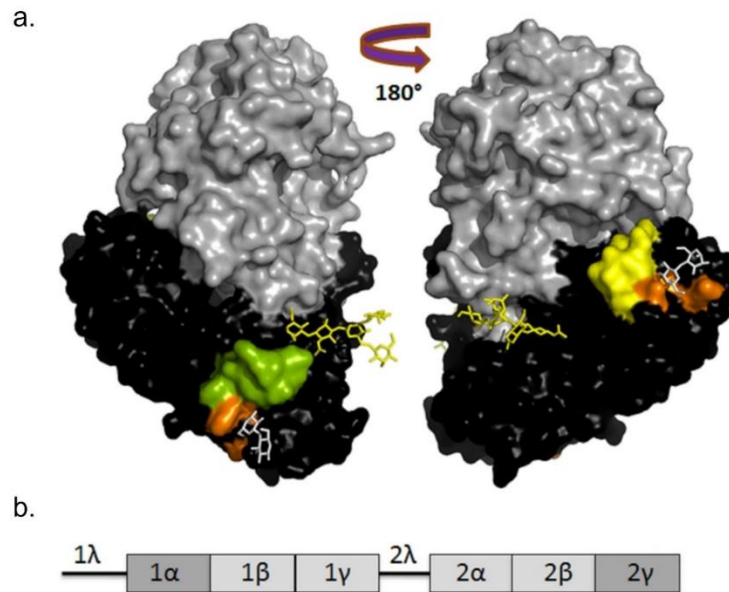
Obecny model funkcjonowania/toksyczności białek RIP został opracowany na podstawie białek typu II jak rycyna. Model ten wskazuje, że białko RIP posiadając aktywności N-glikozydazową, prowadzi tzw. depurynację pojedynczej zasady adeninowej z rRNA w obrębie SRL, która znajduje się w centrum GAC; depurynacja ta prowadzi do zablokowania aktywności GAC, a to z kolei blokuje aktywności rybosomu [39]. Depurynacja zachodzi w pozycji A2660 (numeracja *E. coli*), która odgrywa kluczową rolę w sieci interakcji między trGTPazami a SRL. [153]. Badania biochemiczne wskazały, że białka RIP są w stanie prowadzić depurynację tzw. „nagich” RNA, natomiast ich aktywność N-glikozydazowa wzrasta 100-krotnie w przypadku natywnego rRNA, wskazując, że integralne rRNA to zasadniczy substrat dla białek RIP. Jednym z najbardziej poznany białek RIP jest rycyna, która występuje w nasionach rącznika pospolitego (łac. *Ricinus communis*). Białko to jest uznawane za jedno z najbardziej toksycznych białek występujących w naturze. Pod względem strukturalnym rycyna to hetero-dimer zbudowany z dwóch podjednostek: łańcucha A oraz łańcucha B, połączonych ze sobą mostkiem dwusiarczkowym (Ryc. 27).



**Ryc. 27. Model strukturalny rycyny. a.** holoenzym rycyny **b.** katalityczna podjednostka A rycyny (RTA), **c.** podjednostka B o właściwościach lektyny (RTB).

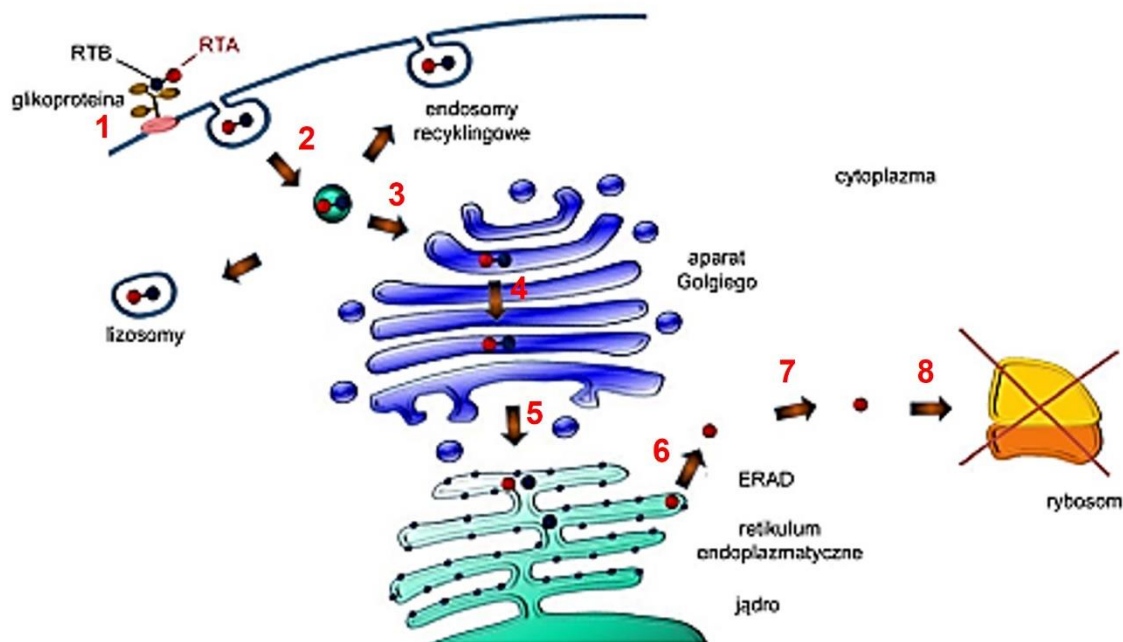
Podjednostka B (RTB) jest galaktozo/*N*-acetylogalaktozamino(Gal/GalNAc)-specyficzną lektyną, której zadaniem jest wiązanie się do białek oraz glikolipidów na powierzchni komórek ssaczych, umożliwiając tym samym efektywną endocytozę toksyny (Ryc. 28) [154]. Podjednostka RTB zbudowana jest z 262 reszty aminokwasowych, które formują dwie domeny. W obrębie tych domen można wyróżnić trzy subdomeny ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), z których funkcjonalną aktywność lektyny wykazują subdomeny  $1\alpha$  i  $2\gamma$  (Ryc. 28). Subdomena  $1\alpha$  jest łącznikiem podjednostek RTA i RTB, natomiast subdomena  $2\gamma$  odpowiada za łączenie dwóch domen podjednostki RTB [155].





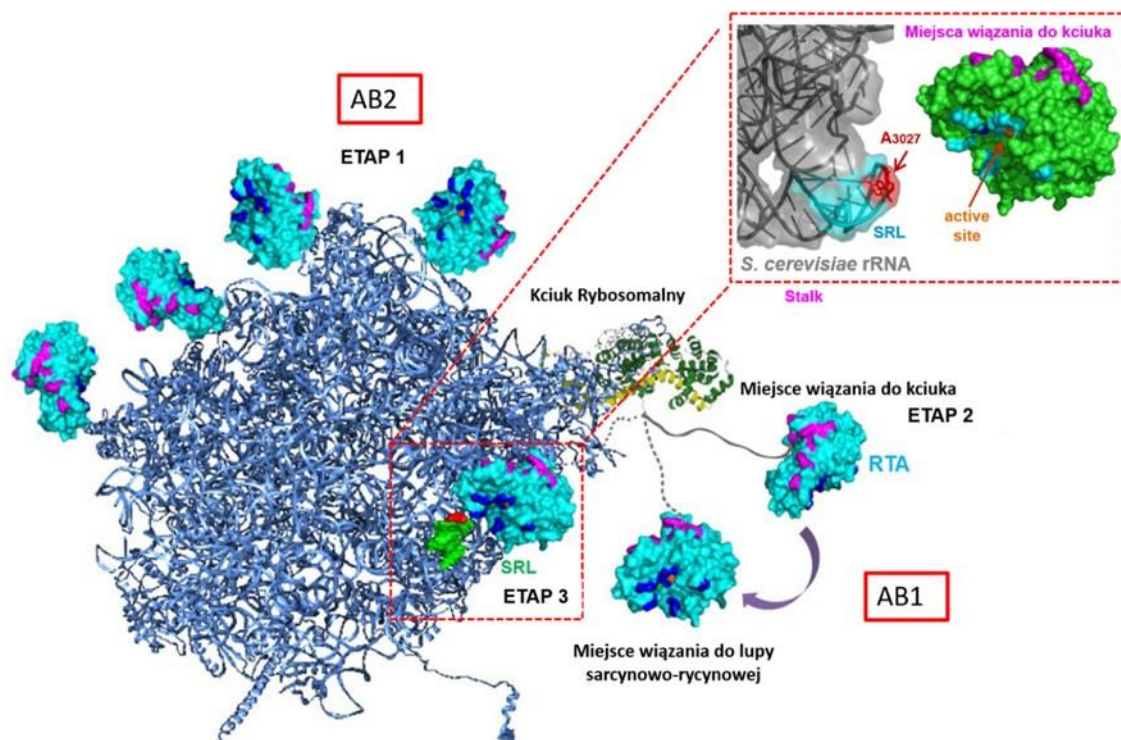
**Ryc. 28. Model strukturalny podjednostek RTB/RTA [155]. a.** Podjednostka RTA została oznaczona kolorem szarym, podjednostka RTB kolorem czarnym. Kolorem żółtym oznaczono epitop dla przeciwciał monoklonalnych SylH3, kolorem zielonym epitop dla przeciwciał monoklonalnych 24B11, kolorem pomarańczowym galaktozo-specyficzna domena rozpoznająca polocukry (ang. *Gal - specific carbohydrate recognition domain*, CRD). Struktury chemiczne reprezentują łańcuchy boczne mannozy (kolor żółty) i cząsteczki laktozy (kolor szary) **b.** schemat liniowy obrazujący domeny podjednostki RTB, a także ich poszczególne subdomeny (1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1 $\gamma$ , 2 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 2 $\gamma$ ).

Transport rycyny do wnętrza komórki eukariotycznej rozpoczyna wiązanie się toksyny za pośrednictwem podjednostki RTB do galaktozy lub N-acetyloglutaminy glikopeptydów i glikolipidów występujących na powierzchni komórki. W komórce, większa część rycyny ulega degradacji lizosomalnej bądź jest akumulowana w endosomach za pomocą których komórka usuwa część frakcji rycyny na zewnątrz komórki. Jednakże pozostała, niewielka część rycyny kierowana jest do aparatu Golgiego skąd jest następnie transportowana do retikulum endoplazmatycznego (ER), gdzie izomeraza dwusiarczkowa (ang. *protein disulphide isomerase*, PDI) redukuje mostek dwusiarczkowy łączący obie podjednostki A i B, uwalniając tym samym katalityczną podjednostkę A rycyny (RTA), posiadającą aktywność N-glikozydazy [156,157]. RTA jest następnie transportowana za pośrednictwem szlaku ERAD (ang. *ER-associated degradation*), co w konsekwencji prowadzi do uwolnienia RTA z retikulum endoplazmatycznego do cytoplazmy (Ryc. 29) [158,159].



**Ryc. 29. Schemat wewnątrzkomórkowego transportu rycyny w komórce eukariotycznej [159].** Na schemacie zaznaczono główne etapy transportu rycyny do wnętrza komórki. Poszczególne etapy to: 1 - wiązanie się do receptora na błonie komórkowej za pośrednictwem podjednostki RTB, 2 - Endocytoza, 3 - część rycyny ulega akumulacji w endosomach i usunięciu poza komórkę, a pozostała, niewielka ilość jest kierowana do aparatu Golgiego, 4 - przemieszczanie się przez cysterne aparatu Golgiego w kierunku retikulum endoplazmatycznego (ER), 5 - transport rycyny do ER, redukcja mostka disiarczkowego łączącego podjednostki RTA i RTB rycyny, 6, 7 - transport aktywnej katalitycznej podjednostki RTA poprzez szlak ERAD do cytoplazmy, 8 - wiązanie do rybosomu.

Zaproponowany mechanizm działania RTA wskazuje, że uwolniona, aktywna katalitycznie podjednostka RTA wiąże się do rybosomu na drodze dwuetapowego procesu; pierwszy etap to wolna i niespecyficzna interakcja na bazie oddziaływań elektrostatycznych z powierzchnią rybosomu, w wyniku których toksyna gromadzi się na powierzchni rybosomu, po czym następują szybkie, wysoko specyficzne oddziaływania za pośrednictwem białek P (Ryc. 30).

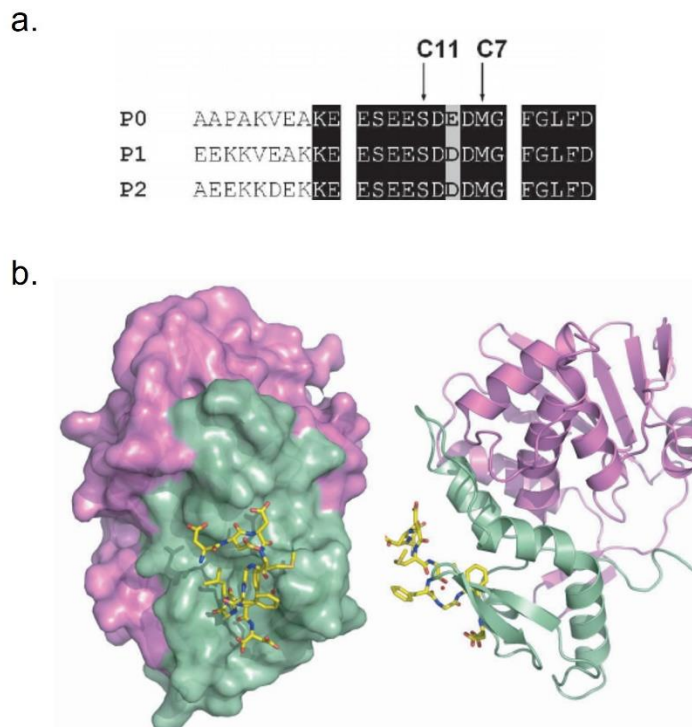


**Ryc. 30. Model interakcji białek RIP grupy II z rybosomem na przykładzie katalitycznej podjednostki rycyny - RTA [160,161].** Model eukariotycznej dużej podjednostki rybosomu, oznaczony kolorem niebieskim, pętla sarcynowo-rycynowej - kolor zielony. Model zawiera reprezentację strukturalną fragmentu białka uL10 w kompleksie z domenami N-terminalnymi białek P, oznaczonych odpowiednio kolorami żółtym i ciemno-zielonym. Nieustrukturalizowana i elastyczna domena C-terminalna białek P została przedstawiona w postaci szarej linii - ciągłej i przerywanej. Katalityczny łańcuch A rycyny - RTA zaznaczono kolorem turkusowym, centrum katalityczne kolorem granatowym, zaś miejsce wiązania z białkami P - kolorem fioletowym. Model przedstawia zachowanie się RTA w obecności rybosomu: w pierwszym etapie cząsteczki RTA ulega koncentracji na powierzchni rybosomu za pomocą niespecyficznych oddziaływań elektrostatycznych (model AB2); drugi etap obejmuje interakcje z białkami P (model AB1). Interakcja białka P-RTA zachodzi przy udziale specyficznych oddziaływań znajdujących się na cząsteczce RTA. C-terminalny element białek P kieruje cząsteczkę RTA w stronę pętli sarcynowo-rycynowej, tak aby zapewnić kontakt między centrum katalitycznym RTA a zasadą adeninową na pętli SRL i co za tym idzie umożliwić toksynie proces depurynacji.

Wykazano, że udział białek P jest kluczowy w interakcji RTA z rybosomem i związanie się RTA z białkami P poprzedza depurynację SRL [157,162–165]. Analizy biochemiczne z udziałem rybosomu po depurynacji SRL, wskazały że działanie RTA przede wszystkim blokuje funkcjonowanie rybosomu na etapie elongacji, a tym samym hamuje syntezę białek. Proces depurynacji za pośrednictwem RTA zachodzi w obrębie zasady adeninowej (pozycja A2660 na 23S rRNA *E. coli* zgodnie z numeracją bakteryjnego rRNA, zaś na eukariotycznym rRNA jest to pozycja: A3027 25S/28S rRNA *S. cerevisiae*, A4324 u szczura, A4605 u ludzi) [41,42,166–168]. Należy podkreślić, że pomimo wysokiej homologii w sekwencji nukleotydowej SRL w obrębie trzech domen życia, tylko rybosomy

eukariotyczne ulegają depurynacji, a czynnikiem determinującym specyficzność są białka P [169]. Wykazano, że jedna cząsteczka RTA w stanie inaktywować w ten sposób do 1500 rybosomów na minutę, co wskazuje na jej bardzo wysoką wydajność biologiczną [170].

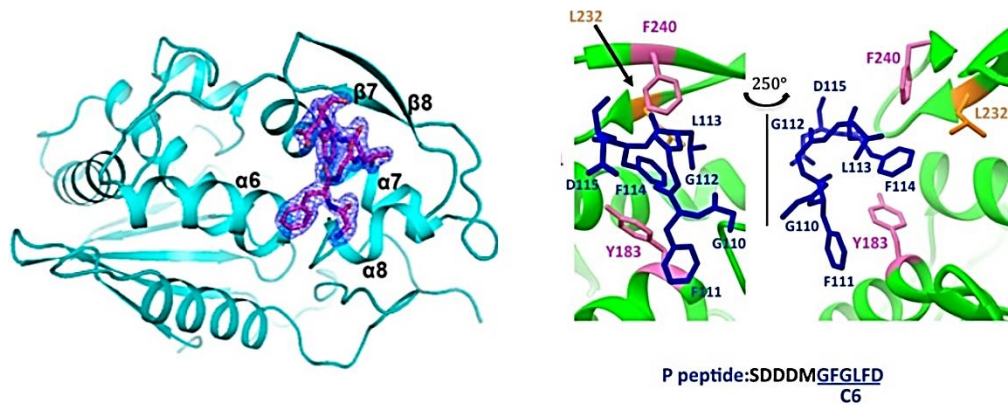
Badania biochemiczne *in vitro* oraz w zakresie biologii komórki *in vivo* wskazały, że białka P, będąc w kompleksie pentamerycznym, tj. dwoma hetero-dimery P1-P2 wraz z białkiem uL10, stanowią kluczowy element wiążący RTA na rybosomie eukariotycznym. [171]. Warto zauważyć, że powinowactwo RTA do rybosomu jest wprost proporcjonalne do ilości białek P na rybosomie, jak wykazano na bazie analiz kinetycznych, wykorzystując zmodyfikowane pod względem ilości białek P rybosomy. Obserwacje te potwierdzają pogląd, że „dostarczanie” białek RIP do SRL zależy od interakcji z białkami P [171,172]. Na przykładzie trichosantyny (TCS), toksyny należącej do typu I, która podobnie jak podjednostka rycyny - RTA, jest w stanie blokować rybosomy eukariotyczne po przez depurynację SRL, wykazano, że TCS wchodzi w interakcje z konserwatywnym motywem domeny CTD eukariotycznych białek P; analizy interakcji TCS z białkami P wykonano na bazie układu modelowego, wykorzystując krótkie syntetyczne peptydy posiadające sekwencję C-terminalnego końca białek P [115]. Badania strukturalne i biochemiczne potwierdziły obserwacje z wykorzystaniem peptydów, wskazując że syntetyczny peptyd odpowiadający C-końcowemu elementowi białek P oddziałuje z białkami RIP [125,160,173]. Analizy strukturalne z wykorzystaniem techniki krystalograficznej kompleksu TCS z syntetycznym peptydem odpowiadającym sekwencji aminokwasowej ludzkiego białka P2 (SDDDMGFGLFD), opisały mechanizm interakcji między TCS a C-końcowym peptydem. Wskazano, że oddziaływania hydrofobowe dominują w stabilizacji kompleksu, ale konserwatywny motyw DDD na N-końcu peptydu także efektywnie oddziałuje z dodatnio naładowanymi resztami K173, R174 i K177 pochodzącymi z TCS, znacząco stabilizując kompleks (Ryc. 31) [174].



**Ryc. 31. Model struktury kompleksu białka TCS z fragmentem C-końcowym białek P [174].**  
**a.** porównanie sekwencji C-końcowych reszt aminokwasowych ssaczych białek P. Zaznaczono sekwencję 16 aminokwasów, będących niemalże identycznych, ze wskazaniem na odcinki obejmujące 11 (C11) i 7 (C7) końcowych aminokwasów, które zostały użyte do formowania kompleksu TCS/C11. **b.** kompleks TCS/C11 obejmujący 11 C-końcowych reszt aminokwasowych SDDDMGFGLFD (kolor żółty), związany z TCS (kolor oliwkowy); kolorem fioletowym oznaczono pozostałe elementy strukturalne TCS; po prawej reprezentacja strukturalna kompleksu z zaznaczonymi strukturami II-rzędowymi.

Ponadto, opracowano także model strukturalny na poziomie atomowym kompleksu RTA z C-końcowym fragmentem ludzkiego białka P2, wskazując że wiązanie peptydu jest podobnie jak w TCS, a oddziaływania elektrostatyczne jak i hydrofobowe grają kluczową rolę w wiązaniu RTA z peptydem [175]. Wskazano, że 6 ostatnich reszt aminokwasowych (GFGLFD) wiążą się do hydrofobowej kieszeni formowanej przez Tyr183, Leu207, Leu232, Phe240, Val242, Ile247, P250 oraz Ile251 na RTA (Ryc. 32) [176,177], zaś oddziaływanie z kwaśnymi resztami aminokwasowymi SDDDM nie zostały precyzyjnie zdefiniowane w żadnej ze struktur, mimo że analiza biochemiczna wykazała, że motyw ten jest ważny dla rozpoznawania rybosomu przez RTA i umożliwienia depurynacji [177–179].





**Ryc. 32. Model struktury kompleksu RTA z syntetycznym peptydem naśladowującym C-końcowy element białka P2** [177,180]. **Panel lewy:** kompleks peptydu obejmujący 10 C-końcowych reszt aminokwasowych DDDMGFGLFD (kolor różowy) z RTA. Kolorem turkusowym przedstawiono strukturę RTA z wyszczególnionymi strukturami  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$ ,  $\beta_7$  oraz  $\beta_8$  formującymi hydrofobową kieszeń, kolorem niebieskim zobrazowano mapę gęstości elektronów dla peptydu C10-P2 wraz z poszczególnymi elementami strukturalnymi peptydu zaznaczonego na kolor różowy. **Panel prawy:** peptyd obejmujący 6 C-końcowych reszt aminokwasowych GFGLFD (kolor niebieski) związany ze strukturą kieszeni hydrofobowej RTA. RTA oznaczono kolorem zielonym, aminokwasy formujące kieszeń kolorem różowym, kluczową dla aktywności RTA Leu232 oznaczono kolorem pomarańczowym.

Pomimo wielu prac badawczych na temat struktury i funkcji białek P oraz ich roli w oddziaływaniu z białkami RIP, model interakcji między tymi białkami nie jest jeszcze dobrze poznany. Większość analiz wykonano *in vivo* z wykorzystaniem mutantów drożdżowych defektywnych w składzie białek P, czy z wykorzystaniem eksperymentalnych układów *in vitro* stosując w większości syntetyczne peptydy jako elementy analityczne w badaniu oddziaływań białek P z białkami RIP. Nieliczne analizy, jak badania z wykorzystaniem kompleksów białek P z drożdży *S. cerevisiae* wykazały, że białka P stanowią kluczowy element w interakcji z białkami RIP. Ponadto wykazano, że białka RIP (np. RTA) posiadają bardzo wysokie powinowactwo w stosunku do białek P w zakresie nanomolarnym, wskazując na ponad przeciętne powinowactwo białek RIP do rybosomu. Jak dotąd nie opracowano precyzyjnego modelu opisującego oddziaływanie białek RIP z białkami P, istnieje jedynie fragmentaryczny wgląd w naturę tych oddziaływań, czy to pod względem strukturalnym czy funkcjonalnym.

## II. CEL PRACY

Niniejsza praca doktorska jest kontynuacją badań prowadzonych w Katedrze Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii i Biotechnologii, UMCS. Podjęte badania dotyczą charakterystyki oddziaływań między rybosomalnymi białkami P formującymi strukturę tzw. „kciuka” rybosomalnego, znajdującego się na dużej podjednostce rybosomu, a katalityczną podjednostką rycyny - RTA. Zasadniczym celem badawczym pracy było otrzymanie rekombinowanych białek, tj. ludzkich rybosomalnych białek P w formie dimeru oraz białka RTA, wykorzystując heterologiczny układ ekspresji oraz charakterystyka pod względem kinetycznym mechanizmów rządzących oddziaływaniem między ludzkimi białkami P a RTA.

Istotą rozprawy jest:

1. Heterologiczna ekspresja i oczyszczanie ludzkich białek rybosomalnych P1, P2 oraz ich form delecyjnych P1<sub>ΔC</sub>/P2<sub>ΔC</sub>, pozbawionych 16 reszt aminokwasowych na C - terminalnym końcu białek P1 i P2;
2. Heterologiczna ekspresja i oczyszczanie katalitycznej podjednostki rycyny – RTA;
3. Charakterystyka biochemiczna i biofizyczna otrzymanych rekombinowanych białek z wykorzystaniem metod chromatograficznych, dichroizmu kołowego oraz spektrometrii mas.
4. Analiza interakcji dimerów białek P1-P2 z katalityczną podjednostką rycyny za pomocą termoforezy mikroskalowej - MST oraz interferometrii bio-warstwowej - BLI.



### III. MATERIAŁY I METODY

#### 1. Manipulacje genetyczne

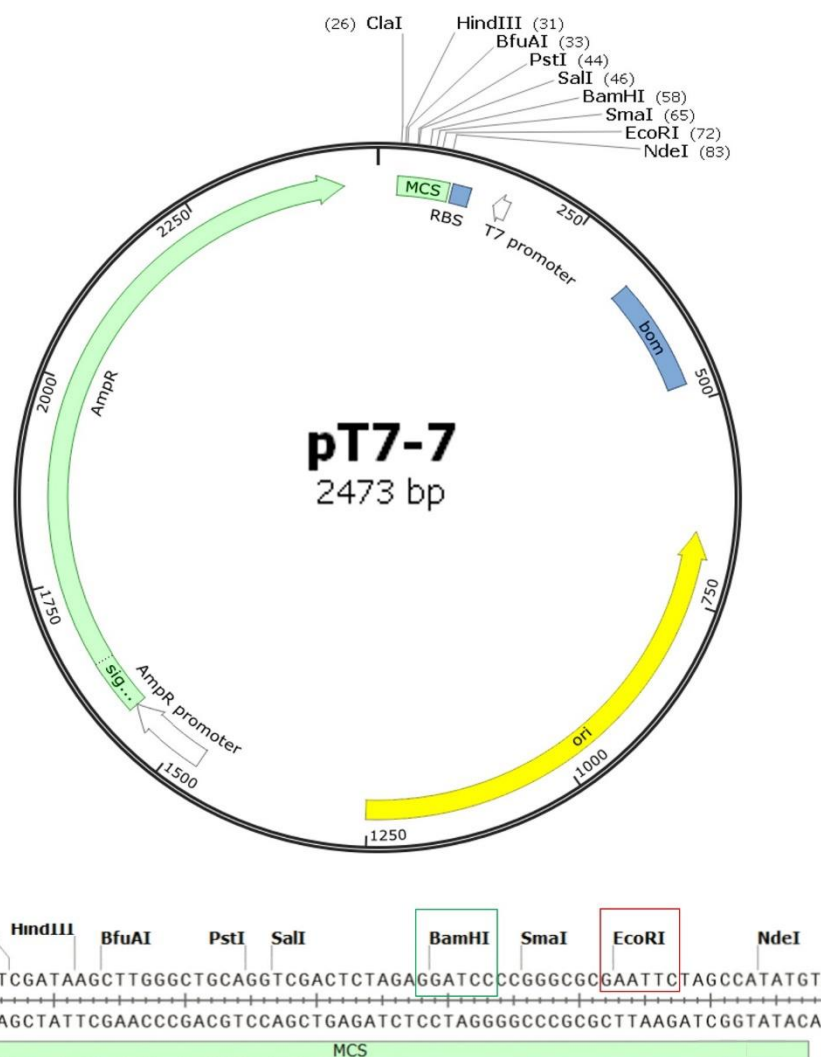
Manipulacje genetyczne wykonano według standardowych procedur [181]. Transformację komórek *E. coli* prowadzono z wykorzystaniem metody TSS [182]. Do trawienia i łączenia fragmentów DNA wykorzystano zestaw enzymów restrykcyjnych oraz ligazę T4 zgodnie z zaleceniami producenta (Fermentas). W celu wizualizacji oraz oceny ilości plazmidowego DNA przeprowadzono elektroforezę w żelu agarozowym o stężeniu agarozy 1,5 % z dodatkiem bromku etydyny w stężeniu 0,5 µg/ml. Żele przygotowano z użyciem ultraczystej agarozy (Prona), którą rozpuszczano w buforze 1 x TAE (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). Próbkę DNA zawieszano w buforze zawierającym 30 % glicerolu oraz 0,1 % bromku etydyny i tak przygotowane nanoszono na żel. Elektroforezę prowadzono w buforze 1 x TAE przy stałym napięciu 100 V. Żele analizowano w świetle UV ( $\lambda_{280-312\text{nm}}$ ). Wielkość i ilość DNA oceniano poprzez analizę porównawczą intensywności prążków DNA z intensywnością prążków markerowych (Fermentas) DNA.

##### 1.1. Przygotowywanie konstruktów genetycznych ludzkich białek P1/P2 i ich form delecyjnych P1 $\Delta$ C/P2 $\Delta$ C

Fragmenty DNA, kodujące geny dla ludzkich białek P1 i P2 oraz ich form delecyjnych P1 $\Delta$ C/P2 $\Delta$ C (tj. nie posiadających 16 C-końcowych aminokwasów), amplifikowano metodą PCR (ang. *polymerase chain reaction*). Wykorzystaną matrycą była biblioteka cDNA otrzymana na bazie komórek HeLa; amplifikację wykonano z wykorzystaniem polimerazy *Pfu* (Fermentas). Sekwencje nukleotydowe wykorzystanych starterów zostały przedstawione w Tabeli 1. Produkty reakcji PCR zostały poddane trawieniu enzymami restrykcyjnymi EcoRI i BamHI, w celu wprowadzenia do wektora ekspresyjnego pT7-7, również traktowanego powyższymi enzymami restrykcyjnymi. Wykorzystany wektor posiadał kasetę genetyczną oporności na ampicylinę, która została wykorzystana jako marker selekcyjny (Ryc. 33). Sekwencje DNA zawierające geny kodujące białka P jak i RTA wszystkich otrzymanych konstruktów genetycznych zweryfikowano poddając je sekwencjonowaniu DNA (usługa komercyjna - firma Genomed S.A.).

**Tabela 2.** Sekwencje nukleotydowe starterów wykorzystanych do amplifikacji fragmentów DNA kodujących geny dla ludzkich białek rybosomalnych P1, P2, P1<sub>ΔC</sub> oraz P2<sub>ΔC</sub>. Podkreśleniem zaznaczono miejsca cięcia dla enzymów restrykcyjnych - kolorem czerwonym dla enzymu EcoRI, kolorem zielonym dla enzymu BamHI.

Amplifikowane DNA dla białka	Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa startera
P1	P1Fwd	5'- GGAG <u>GAATTC</u> GCATGGCCTCTGTCTCCGAGCTC -3'
	P1Rvs	5'- GCG <u>GGATCC</u> CATGTTATAAAAGAGGTTTAGTC -3'
P2	P2Fwd	5'- GCG <u>GAATTC</u> CGATGCGCTATGTGGCGAGCTAT -3'
	P2Rvs	5'-GCG <u>GGATCC</u> ATCAAACAGGCCAAAGCCCATAT-3'
P1 <sub>ΔC</sub>	P1 <sub>ΔC</sub> Fwd	5'- GGAG <u>GAATTC</u> GCATGGCCTCTGTCTCCGAGCTC -3'
	P1 <sub>ΔC</sub> Rvs	5'-GCG <u>GGATCC</u> TTTCTTTGCTTCCACTTTC-3'
P2 <sub>ΔC</sub>	P2 <sub>ΔC</sub> Fwd	5'- GCG <u>GAATTC</u> CGATGCGCTATGTGGCGAGCTAT -3'
	P2 <sub>ΔC</sub> Rvs	5'-GCG <u>GGATCC</u> TTTTTCATCTTTTTTTTCTTC -3'



**Ryc. 33. Wektor ekspresyjny pT7-7.** Kolorem zielonym zaznaczono kasetę oporności na antybiotyki - ampicylinę (AmpR) oraz polilinker, miejsce klonowania (ang. *multicloning site*, MCS), kolorem żółtym zaznaczono miejsce inicjacji procesu replikacji DNA (ang. *origin*, ori), kolorem niebieskim miejsce wiązania rybosomu (ang. *Ribosome Binding Site*, RBS); poniżej schematu wektora pT7-7 pokazano sekwencję MCS ze wskazanymi miejscami trawienia dla różnych enzymów restrykcyjnych. Ramkami zaznaczono miejsca trawienia dla enzymów restrykcyjnych wykorzystanych do przygotowania konstrukcji genetycznych białek P, odpowiednio: BamHI (ramka zielona) oraz EcoRI (ramka czerwona).

## 2. Heterologiczna ekspresja ludzkich białek P w *Escherichia coli*

Heterologiczną ekspresję rekombinacyjnych białek rybosomalnych przeprowadzono z wykorzystaniem szczepu *E. coli*: BL21(DE3). Genom szczepów *E. coli* posiada zintegrowany gen polimerazy RNA faga T7 co zapewnia ekspresję genów w użytych konstrukcjach genetycznych pod kontrolą promotora T7. Hodowlę komórek *E. coli* zawierających przygotowane konstrukty genetyczne prowadzono w objętości 100 ml pożywki LB (ang. *Luria-Broth*). Pożywkę zaszczipiono z wykorzystaniem pojedynczej,

wyselekcjonowanej kolonii bakterii posiadających w komórkach właściwy konstrukt genetyczny. Hodowla suplementowana była ampicyliną w stężeniu końcowym 100 µg/ml. Hodowla startowa była prowadzona przez okres 12 h w temperaturze 37 °C. Następnie z hodowli pobierano 10 ml zawiesiny do zaszczepienia właściwej hodowli ekspresyjnej, prowadzonej w objętości 1000 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny o stężeniu 100 µg/ml. Tak przygotowaną hodowlę prowadzono w temperaturze 37 °C w inkubatorze z wytrząsaniem (Innova 44, New Brunswick). W trakcie prowadzenia hodowli prowadzono pomiary gęstości optycznej hodowli przy długości fali 600 nm ( $OD_{600}$ ) w celu określenia dynamiki i gęstości hodowli bakteryjnej. W momencie osiągnięcia  $OD_{600}$  na poziomie 0,8 indukowano ekspresję dodając do hodowli induktora izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozydu (IPTG), do stężenia końcowego 1 mM. Po indukcji hodowlę kontynuowano przez kolejne 4 h. Po tym czasie zawiesinę bakterii zebrano na drodze wirowania (5 min., 8 000xg, 4 °C), a następnie uzyskane bakterie w formie osadu zawieszano w buforze PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $Na_2HPO_4$ , 2 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7,4) i poddawano ponownemu wirowaniu, w tych samych warunkach, w celu usunięcia pozostałości pożywki hodowlanej. Otrzymany osad zawieszono w buforze dezintegracyjnym (100 mM bufor fosforanowy pH 7,6, 150 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptoetanol, 1 mM PMSF), a następnie przeprowadzono dezintegrację komórek bakteryjnych za pomocą ultradźwięków. Dezintegrację prowadzono w temperaturze 4 °C. Otrzymaną zawiesinę wirowano (5 minut, 8 000xg, 4 °C) w celu usunięcia niezdezintegrowanych komórek bakteryjnych. Poziom ekspresji poszczególnych białek rekombinowanych badano wykonując analizę elektroforetyczną w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), niosząc frakcję białek w ilości 20 µg na żel poliakrylamidowy o stężeniu 13,8%. Analiza SDS-PAGE wykonywana była zgodnie ze standardową procedurą [183].

### **3. Oczyszczanie ludzkiego rekombinowanego białka P1 i formy delecyjnej P1<sub>ΔC</sub>**

Dane literaturowe [184,185] oraz badania prowadzone w Katedrze Biologii Molekularnej UMCS dostarczyły informacji o lokalizowaniu się rekombinowanego ludzkiego białka rybosomalnego P1 w nierozpuszczalnej frakcji białek, zwanej frakcją „ciałek inkluzyjnych” - IB (ang. *Inclusion Bodies*). W celu oczyszczenia białek P1 oraz jego formy delecyjnej P1<sub>ΔC</sub> przeprowadzono dezintegrację komórek bakteryjnych za pomocą

ultradźwięków. Prowadzono ją w temperaturze 4 °C w 10 seriach, każda trwająca 1 minutę, z zachowaniem 1 minutowych przerw. Procedura prowadzona była w buforze dezintegracyjnym o składzie: 100 mM bufor fosforanowy pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptoetanol, 1 mM PMSF. Zawiesinę bakterii po dezintegracji wirowano, 5 minut, 8 000xg, 4 °C, w celu usunięcia niezdezintegrowanych komórek bakteryjnych. Otrzymany supernatant ponownie poddano wirowaniu, 30 000xg, 30 minut w temperaturze 4 °C, co pozwoliło na separację frakcji ciałek inkluzyjnych w formie osadu od rozpuszczalnej frakcji białek. Osad zawierający ciała inkluzyjne homogenizowano w buforze dezintegracyjnym z dodatkiem 2% Triton X-100 oraz 0,5 M NaCl, a następnie wirowano (30 000xg, 15 minut, 4 °C). Tak przygotowana frakcja ciałek inkluzyjnych została wykorzystana do formowania kompleksów P1-P2. Ilość białka określono metodą Bradford's, z zastosowaniem komercyjnie dostępnego odczynnika (Bio-Rad). użytym białkiem referencyjnym była albumina surowicy bydlęcej (standard firmy Sigma).

#### **4. Oczyszczanie ludzkiego rekombinowanego białka P2 i formy delecyjnej P2<sub>ΔC</sub>**

Rekombinacyjne białko P2 lokalizuje się we tzw. frakcji białek rozpuszczalnych w środowisku wodnym [185]. Proces oczyszczania białka P2 i jego formy delecyjnej prowadzono w tzw. warunkach natywnych, wykorzystując jako materiał wyjściowy frakcję cytoplazmatyczną S30, która została otrzymana na drodze wirowania różnicowego; w skrócie, komórki dezintegrowano jak opisano powyżej, a następnie frakcję cytoplazmatyczną poddawano dwuetapowemu wirowaniu: 30 000xg, 15 minut, 4 °C oraz 100 000xg przez 2 godziny w temperaturze 4 °C. Otrzymano frakcję rozpuszczalnych białek zwaną frakcją S100. Uzyskaną frakcję S100 poddawano ekstrakcji etanolowej. W tym celu frakcję S100 mieszano w stosunku objętościowym 1:1 z buforem do ekstrakcji kwaśnych białek (bufor BP 0,5) o składzie: 10 mM Tris pH 7,4, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM β-merkaptoetanol, 0,5 M NH<sub>4</sub>Cl. Otrzymaną mieszaninę inkubowano 5 minut w temperaturze 0 °C. W kolejnym kroku do mieszaniny dodano 1 objętość zimnego 96 % etanolu i inkubowano w temperaturze 0 °C przez 10 minut. Po czasie inkubacji ponownie dodano 1 objętość zimnego 96 % etanolu. Tak uzyskaną mieszaninę poddano wirowaniu: 10 000xg, 15 minut, 4 °C. Otrzymany supernatant dializowano przez 12 godzin

w temperaturze 4 °C wobec buforu o składzie: 25 mM TRIS pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 5 mM β-merkaptoetanol, 0,5 mM PMSF.

Uzyskany preparat poddano oczyszczaniu metodą chromatografii jonowymiennej na kolumnie jonowymiennej *ResourceQ* o pojemności 1 ml w systemie FPLC Akta Purifier, Pharmacia Biotech. Podobnie jak w przypadku białka P1 poziom oczyszczenia uzyskanego preparatu oraz wcześniej otrzymanych w toku oczyszczania frakcji, oceniono na podstawie obrazu elektroforetycznego SDS-PAGE.

## 5. Formowanie kompleksów białek P

Formowanie kompleksów białkowych odbyło się według wcześniej opracowanych metod, na drodze wspólnej denaturacji i renaturacji [106,109,184]. Do procesu denaturacji wykorzystano metodę dializy w buforze denaturującym zawierającym 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 oraz 6 M chlorowodorek guanidyny (Gdn-HCl) z dodatkową suplementacją 10 mM DTT. Dializa prowadzona była przez 12 h.

W kolejnym kroku łączono białka P1 i P2 oraz ich formy delecyjne, w stosunku molowym odpowiednio 3:1, w następujące kompleksy:

- Heterodimer P1-P2
- Heterodimer P1<sub>ΔC</sub>-P2
- Heterodimer P1-P2<sub>ΔC</sub>
- Homodimer P2-P2 (kompleks tworzący się spontanicznie przy braku białka P1 w roztworze)
- Heterodimer P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>
- Homodimer P2<sub>ΔC</sub>- P2<sub>ΔC</sub>

Po połączeniu odpowiednich białek poddawano je wspólnej renaturacji przy pomocy dializy wobec buforu renaturującego o składzie: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM KCl i 5 mM MgCl<sub>2</sub>. W trakcie dializy obserwowano powstawanie agregatów niespecyficznie wiążących się białek. Usuwano je na drodze wirowania przy 30 000xg przez 15 minut. Tak uzyskane kompleksy białkowe poddawano analizie metodą SDS-PAGE, a następnie oczyszczano metodą sita molekularnego na kolumnie Superose 12, HR 10/30. Oczyszczone, specyficzne

kompleksy białkowe wykorzystywano bezpośrednio do kolejnych, zaplanowanych analiz bądź zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80 °C.

## **6. Heterologiczna ekspresja i oczyszczanie aktywnej katalitycznej podjednostki rycyny (RTA)**

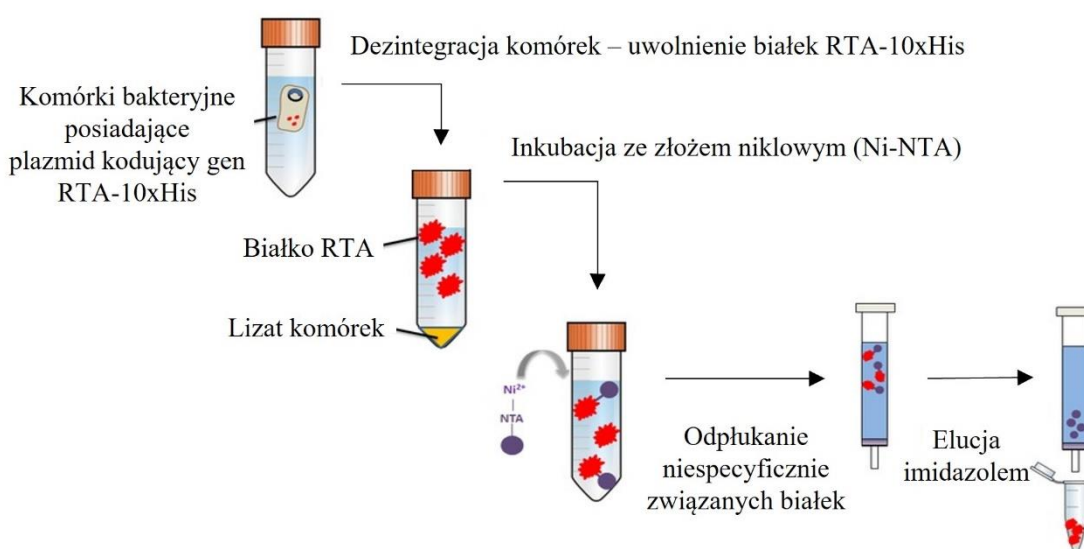
Do nadekspresji katalitycznej podjednostki RTA wykorzystano konstrukt genetyczny udostępniony przez Prof. Nilgun Tumer (Department of Plant Biology, Rutgers SEBS). Konstrukt z katalityczną podjednostką rycyny oparty był o wektor ekspresyjny pET32 (a) + (Novagen), który jest wektorem dedykowanym do klonowania i ekspresji na wysokim poziomie sekwencji peptydowych połączonych z białkiem tioredoksyny 109aa Trx-Tag. Miejsca klonowania wykorzystanego wektora są także dostępne do produkcji białek fuzyjnych zawierających sekwencje His-Tag i S -Tag do wykrywania i oczyszczania. Do wektora klonowano gen kodujący podjednostkę RTA z dołączoną do N-terminalnego końca sekwencją etykiety histydynowej 10xHis-Tag, która usprawniła późniejszy proces oczyszczania. Markerem selekcyjnym wektora był gen kodujący kasetę oporności na kanamycynę (Kam<sup>R</sup>) oraz dodatkową etykietkę 10xHis dołączoną do C-terminalnego końca.

Heterologiczną ekspresję katalitycznej podjednostki rycyny prowadzono w komórkach szczepu *E.coli* BL21(DE3)RIL analogicznie do nadprodukcji białek P. Uzyskany produkt – białko RTA, oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa na złożu niklowym (Ni-NTA, Qiagen). W tym celu komórki bakteryjne posiadające plazmid niosący gen RTA-10xHis dezintegrowano przy pomocy ultradźwięków w buforze zawierającym 20 mM TRIS, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10 % glicerol, 1 mM PMSF oraz 5 mM DTT (bufor A zestawu Qiagen). Tym samym buforem wykonano kalibrację złoża Ni-NTA w stosunku objętościowo-objętościowym 10:1. Kalibrację złoża powtórzono trzykrotnie.

W kolejnym etapie zawiesinę wirowano (30 000xg, 15minut), zaś osad zawierający lizat komórek odrzucano. Supernatant mieszano następnie z Tritonem X-100 do końcowego stężenia 1 %, a otrzymaną mieszaninę inkubowano w temperaturze 0 °C na wytrząsarce kołyskowej przez 40 minut. Po tym czasie roztwór wirowano (200 000xg/45 min./0 °C) zaś otrzymaną frakcję supernatantu наносono na wcześniej przygotowane złożo niklowe i poddawano inkubacji w temperaturze 0 °C, na wytrząsarce kołyskowej przez 30 minut. Po



delikatnym zwirowaniu złoża (8 000xg, 40 sec), supernatant zbierano do końcowych analiz elektroforetycznych, natomiast osad zawierający złoże niklowe z zaabsorbowanym białkiem RTA-10xHis poddawano serii płukań w celu pozbycia się niespecyficznie związanych białek. Do tego celu wykorzystano bufor o składzie: 20 mM TRIS, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10 % glicerol (bufor B zestawu Qiagen). Otrzymane frakcje kolekcjonowano do końcowych analiz metodą SDS-PAGE. Finalnym etapem oczyszczania RTA-10xHis była elucja białka ze złoża wobec buforu o wysokiej zawartości imidazolu jako czynnika elucyjnego (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, 400 mM imidazol, 10 % glicerol; bufor C zestawu Qiagen). Schemat najważniejszych etapów oczyszczania zamieszczono na Ryc. 34.



**Ryc. 34. Schemat przedstawiający etapy preparatyki białka RTA-10xHis z wykorzystaniem metody chromatografii powinowactwa.**

Supernatant uzyskany po odwirowaniu złoża niklowego (8 000xg, 40 sec), mierzono pod kątem stężenia białka (Bradford) i analizowano na 12 % żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących razem z frakcjami uzyskiwanymi na poszczególnych etapach oczyszczania.

W procesie oczyszczania wykorzystano chromatografię powinowactwa z uwagi na obecność etykiety histydynowej. Wybór złoża niklowego podyktowany został faktem selektywnego wiązania się reszt histydyn pochodzących z etykiety znajdującej się na N-końcowej części sekwencji genetycznej konstrukt, do jonów niklu.

## **7. Charakterystyka biochemiczna i biofizyczna otrzymanych białek rekombinowanych**

### **7.1. Chromatografia sączenia/sita molekularnego**

Chromatografia cieczowa na żelu Sephadex, określana też jako sączenie molekularne, chromatografia sita molekularnego czy też filtracja żelowa, jest techniką umożliwiającą analityczny bądź preparatywny rozdział substancji różniących się masą cząsteczkową. Sephadex jest handlową nazwą złoża stanowiącego poprzecznie usieciowane łańcuchy dekstranu. Żel ten ma postać granulek o średnicy 10-300  $\mu\text{m}$ , które w zależności od usieciowienia, różnią się zdolnością wchłaniania wody. Cecha ta decyduje o właściwościach rozdzielczych żelu. Stopień usieciowienia złoża określa cyfra znajdująca się przy dużej literze "G" (od G-10 do G-200), przy czym im większa cyfra tym niższe usieciowienie. Cząsteczki większe niż pory napęczniałych ziaren żelu nie mogą penetrować do ich wnętrza, a więc przepływają wraz z fazą ruchomą i są eluowane jako pierwsze. Mniejsze cząsteczki wnikające w różnym stopniu do wnętrza granulek żelu, w zależności od swego kształtu i rozmiaru, eluowane są w kolejności zmniejszania się ich masy cząsteczkowej.

Chromatografię sita molekularnego wykonano przy pomocy systemu FPLC Äkta Purifier firmy GE Healthcare Life Science. Wykorzystano kolumnę Superose 12 HR 10/30. W celu uzyskania warunków natywnych kolumna była równoważona buforem o następującym składzie: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, natomiast przy prowadzeniu doświadczenia w warunkach denaturujących powyższy bufor jak i badaną próbkę suplementowano 8 M mocznikiem. Szybkość przepływu wynosiła 0,2 ml/min. Profil elucji białka monitorowano przy 280 nm i analizowano za pomocą programu UNICORN v. 4.0 dostarczonego przez systemem FPLC.

### **7.2. Dichroizm kołowy (ang. *Circular Dichroism*, CD)**

W celu analizy struktury drugorzędowej badanych białek wykorzystano metodę dichroizmu kołowego (ang. *Circular Dichroism*, CD). Jest to metoda spektroskopowa służąca m.in. do obserwacji procesu rozfałdowywania/defoldingu i ponownego fałdowania

się białek pod wpływem m.in. czynnika termicznego. Wyniki analiz służą do określenia entalpii van't Hoffa ( $\Delta H$ ) i entropii ( $\Delta S$ ) procesu rozfałdowywania. Analizy widm CD, uzyskanych jako efekt czynnika termicznego, umożliwiają również określenie punktu, tzw. *melting point*, będącego punktem pośrednim pomiędzy stanem natywnym a stanem zdenaturowanym białek [186].

Pomiary dichroizmu kołowego (CD) wykonywano przy użyciu spektropolarymetru Chirascan Plus Spectrometer (Applied Photophysics, U.K.). Do doświadczeń wykorzystano bufor o składzie: 50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Bezpośrednio przed pomiarem roztwory białek odwirowywano przy prędkości 15 000xg przez 15 minut w celu usunięcia ewentualnych agregatów oraz wytrąconych z roztworu białek. Pomiary CD prowadzone były w temperaturze 25 °C. Stężenie analizowanych białek określono na podstawie absorbancji przy 280 nm, stosując współczynnik ekstynkcji dla każdego kompleksu białkowego. Pomiary prowadzono przy następujących parametrach:

- szybkością rejestrowania danych: 60 nm/min.,
- szczelina 1 nm, zakres 200 - 250 nm,
- kuweta o drodze optycznej 0,2 cm.

Każde z widm rejestrowano w trzech powtórzeniach, a następnie uzyskane wartości uśredniano. Uzyskiwany sygnał przeliczano następnie na eliptyczność molową  $[\Theta]$  (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>), według zależności:

$$[\Theta] = \frac{[\Theta \text{ obs}]}{10 \cdot n \cdot l \cdot c}$$

gdzie:

$[\Theta \text{ obs}]$  to eliptyczność wyrażona w mdeg,

c - stężenie molowe (mol/dm<sup>3</sup>),

l - długość drogi optycznej w cm,

n - ilość reszt aminokwasowych badanego białka.

Zarejestrowane widma analizowano przy pomocy oprogramowania Grams/AI (Thermo Scientific).

### 7.3. NanoDSF - pomiar punktu topnienia (ang. *Melting point*, T<sub>m</sub>)

Analizy termostabilności kompleksów białkowych zostały przeprowadzone z wykorzystaniem zaawansowanej techniki skaningowej fluorymetrii nano-różnicowej. Technika ta opiera się na detekcji najmniejszych zmian fluorescencji aminokwasów aromatycznych (głównie tryptofanu) obecnych w białkach. Podstawami fluorymetrycznej analizy fałdowania białek bez wykorzystania znaczników są właściwości fluorescencyjne tryptofanu. Tryptofan jest aminokwasem hydrofobowym, znajdującym się głównie w tzw. hydrofobowym rdzeniu białek, gdzie jest osłonięty przed otaczającym go wodnym rozpuszczalnikiem. Jednak po denaturacji białka, skutkującej „rozwinęciem” jego struktury, tryptofan zostaje odsłonięty, co zmienia jego właściwości fotofizyczne. Wykrywając zmiany w intensywności fluorescencji tryptofanu i przesunięcie jego piku emisji, możliwe było precyzyjne określenie momentu przejścia białka ze stanu natywnego do stanu rozfałdowanego. Wykorzystane urządzenie, Prometheus NT.48, umożliwiło zarejestrowanie wewnętrznych zmian fluorescencji białek po ich termicznej lub chemicznej denaturacji. Urządzenie to monitoruje przesunięcie wewnętrznej fluorescencji tryptofanu białek po ich rozwinięciu przez pomiar fluorescencji przy długości fali 330 i 350 nm. W celu określenia temperatury topnienia białka tj. stanu, w którym połowa białka jest w stanie natywnym, a druga połowa jest w stanie zdenaturowanym wykorzystano stosunek intensywności fluorescencji F<sub>350</sub>/F<sub>330</sub> i wyliczenie punktu topnienia poszczególnych kompleksów.

Charakterystykę stabilności termicznej wykonano poprzez obserwację i zapis widm zmian eliptyczności przy stałej długości fali 222 nm (ze względu na  $\alpha$ -helikalny typ budowy strukturalnej białek P [187]) w zakresie temperatur 20-90°C, przy współczynniku wzrostu temperatury na poziomie 0,5 °C/min. Pomiar wykonywano w kuwecie o drodze optycznej 1 mm z wykorzystaniem białka w stężeniu 50  $\mu$ g/ml. Po schłodzeniu badanych próbek analizowano odwracalność procesu denaturacji termicznej poprzez wykonanie kolejnych rejestracji widm w tych samych warunkach.

### 7.4. Spektrometria mas

Spektrometria masowa (ang. *Mass Spectrometry*, MS) to technika analityczna pozwalająca na dokładny pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego jonu, co, przy

znany ładunku jonu, pozwala obliczyć masę z dokładnością do pojedynczych atomów. Wykorzystując łagodne warunki jonizacji, możliwym było uzyskanie informacji strukturalnych o kompleksach białkowych poprzez analizę ich stechiometrii oraz wzajemnych oddziaływań. Metoda ta, pozwala także badać niekonwalencyjne oddziaływania między białkami tworzącymi kompleks jednocześnie umożliwiając badanie ich stabilności strukturalnej [188].

Wszystkie kompleksy białek analizowane były z użyciem spektrometru mas SYNAPT G2-Si High Definition Mass Spectrometer (Waters, Manchester, U.K.). Eksperymenty prowadzono przy zmianach dwóch podstawowych parametrów: napięcia przyłożonego do kapilary (w zakresie od 80 do 140V) oraz napięcia w komorze kolizyjnej (w zakresie od 20 do 160V). Tuż przed właściwą analizą kompleksy białkowe były poddane dializie wobec 200 mM buforu octanu amonu o pH 7,5 z wykorzystaniem kolumn chromatograficznych Micro Bio-Spin (Bio-Rad). Tak przygotowane roztwory białek w ilości 2  $\mu$ L wprowadzono do spektrometru przy pomocy nanoprzepływowych kapilar w następujących warunkach:

- Napięcie przyłożone do kapilar – 1.2kV
- Napięcie w komorze kolizyjnej – 120V
- Source offset – 20V
- Temperatura - 25°C

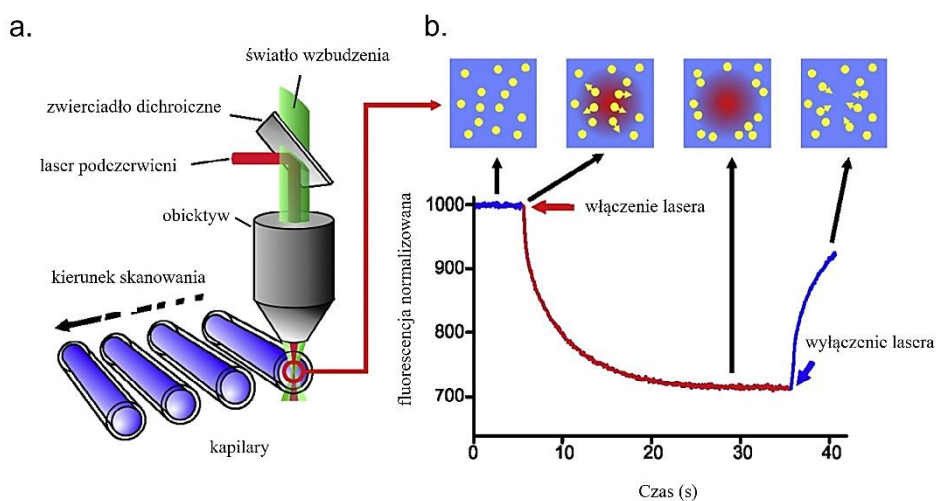
Maksymalną entropię (MaxEnt, Waters) dekonwolucji zastosowano do danych elektrorozpylania w celu ponownego obliczenia istniejących mas w fazie gazowej.

## **8. Analiza interakcji dimerów białek P1-P2 z katalityczną podjednostką rycyny (RTA)**

W celu zbadania interakcji pomiędzy dimerami ludzkich białek P a białkiem rekombinowanym RTA-10xHis wykorzystano nowatorską metodę termoforezy mikroskalowej (ang. *Microscale Thermophoresis*, MST) oraz metodę interferometrii bio-warstwowej (ang. *bio-layer interferometry*, BLI).

## 8.1. Termoforeza mikroskalowa (Microscale Thermophoresis, MST).

Termoforeza mikroskalowa jest szybką i precyzyjną metodą ilościowej oceny interakcji zachodzących pomiędzy biomolekułami. Fundamentem termoforezy jest ruch cząstek pod wpływem gradientu temperatur, będącym ściśle zależnym od właściwości molekularnych cząsteczki takich jak wielkość, ładunek czy otoczka hydratacyjna. Jest to metoda bardzo czuła na zmiany na poziomie molekularnym, co pozwala na precyzyjną obserwację procesów zależnych od wielkości bądź struktury badanej cząstki [189]. Ponadto pozwala ona także na poznanie mechanizmu, a w perspektywie modelu molekularnego interakcji pomiędzy biomolekułami oraz określenie termodynamiki i stechiometrii tej reakcji. Za indukcję gradientu temperaturowego odpowiedzialny jest laser podczerwieni, oddziaływający na kapilary z badanymi próbkami. Dyfundowanie cząsteczek z obszaru wpływu lasera poza granice jego oddziaływania jest wykrywane i oceniane ilościowo za pomocą pomiaru fluorescencji kowalentnie dołączonych bądź wewnętrznych fluoroforów (Ryc. 35).



**Ryc. 35. Schemat przedstawiający optykę urządzenia MST [190]. a.** Termoforeza rejestrowana jest w 16 kapilarach o pojemności około 4  $\mu\text{l}$ . Fluorescencja jest wzbudzana za pomocą lasera podczerwieni i rejestrowana przy pomocy tego samego obiektywu. **b.** Typowy sygnał pomiaru termoforetycznego. Początkowo cząsteczki są rozmieszczone homogenicznie i wykazują stałą poziom „fluorescencji początkowej”. W pierwszych sekundach po aktywowaniu lasera podczerwieni (włączenie) obserwowany jest skok temperatury, tzw. T-jump, który jest miarą nagłej zmiany właściwości fluoroforów związaną z gwałtowną zmianą temperatury. Następnie obserwowane jest termoforetyczne przemieszczanie się wyznakowanych fluorescencyjnie cząsteczek poza granice obszaru poddawanego wzrostowi temperatury. Pomiar termoforetyczny prowadzony jest przez 30 sekund. Po tym czasie, laser jest wyłączany i rejestrowany jest tzw. odwrócony T-jump, spowodowany dyfuzją zwrotną cząsteczek.

Pomiary termoforetyczne wykonano przy użyciu systemu Monolith NT.115 Series (NanoTemper Technologies). W przeprowadzonym eksperymencie znakowaną molekułą było oczyszczone białko RTA. Zostało ono przygotowane zgodnie z instrukcją producenta, przy pomocy zestawu odczynników Monolith NT™ RED NHS NT647 dedykowanego do urządzenia Monolith NT™ (NanoTemper Technologies). Wykorzystano do tego celu barwnik NT-647 NHS. Jest to barwnik o budowie NHS-estru, który wydajnie reaguje z aminami pierwszorzędowymi białek, tworząc wysoko stabilny koniugat barwnik-białko. Grupy aminowe znajdują się m.in. w resztach lizyny, które są zazwyczaj łatwo dostępne dla rozpuszczalników, a co za tym idzie odpowiednie do reakcji znakowania. Barwnik wykazuje poziom ekscytacji i maksima emisji przy długości fali około 650 i 670 nm.

Stosunek barwnika fluorescencyjnego do białka został oznaczony przy pomocy pomiaru fotometrycznego przy długości fali 650 nm oraz 280 nm. Z uwagi na fakt powinowactwa barwnika do pierwszorzędowych amin bufor reakcyjny nie mógł on zawierać związków takich jak TRIS, glicyna, etanolamina czy glutation. Niepożądanym składnikiem był także imidazol. Z tego względu przed rozpoczęciem znakowania cząsteczki RTA niezbędnym było przeprowadzenie reakcji wymiany buforu. W tym celu reakcja znakowania została poprzedzona krokiem A z protokołu producenta (Step A: Buffer Exchange).

Następnie dostosowano stężenie tak przygotowanego roztworu zawierającego białko RTA do poziomu 20 nM wykorzystując do serii rozcieńczeń bufor do znakowania, tak aby finalnie otrzymać 100 µl roztworu białka. Molarność próbki wyliczono przy pomocy wzoru:

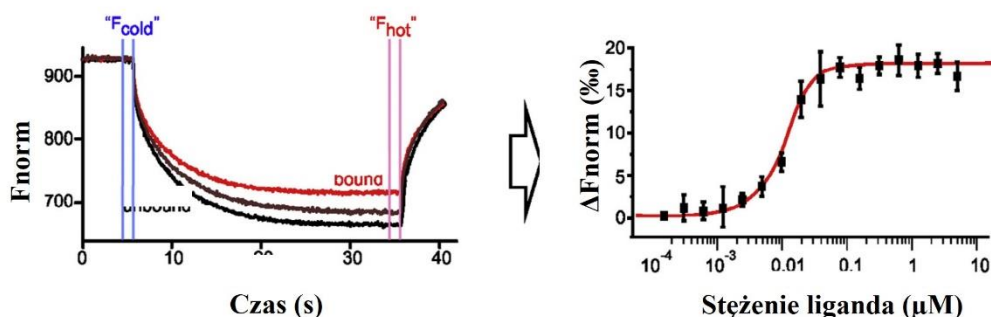
$$c(\text{Protein}) [\text{Mol/l}] = \frac{c(\text{Protein}) [\text{mg/ml}]}{\text{MW}(\text{Protein}) [\text{Da}]}$$

Przygotowany roztwór białka łączono następnie z roztworem barwnika fluorescencyjnego o stężeniu 40 nM, w stosunku 1:2, otrzymując finalnie mieszaninę o objętości 200 µl. Tak przygotowaną próbkę inkubowano przez 30 minut bez dostępu światła. W międzyczasie przygotowywano serię 16 dwukrotnych rozcieńczeń, nieznakowanych w tej wersji eksperymentu, dimerów białek P1-P2. Do tak przygotowanych roztworów dimerów dodawano po 10 µl wyznakowanego białka RTA do 20 µl finalnej objętości mieszaniny oraz o stężeniu białek zaczynając od 50, a kończąc na 100 µM.

Pomiary wykonano w temperaturze 25 °C i przy parametrach wyłączenia/włączenia/ponownego wyłączenia lasera odpowiednio 5/30/5 sekund. Parametry urządzenia zostały ustawione na 90% mocy diody LED oraz 20 % mocy termoforezy mikroskalowej (MST).



Analizę termoforezy oraz zmiany właściwości fluoroforów wywołaną nagłym skokiem temperatury (T-jump) wykonano za pomocą oprogramowania dołączonego do urządzenia (NanoTemper's NT analysis software; version 1.5.41). Zmiana termoforezy została wyrażona jako zmiana znormalizowanej fluorescencji ( $\Delta F_{\text{norm}}$ ), która jest zdefiniowana jako stosunek fluorescencji w fazie  $F_{\text{hot}}/F_{\text{cold}}$  (wartości  $F$  odpowiadają średnim wartościom fluorescencji między zdefiniowanymi obszarami oznaczonymi na Ryc. 36, odpowiednio czerwonymi i niebieskimi kursorami).



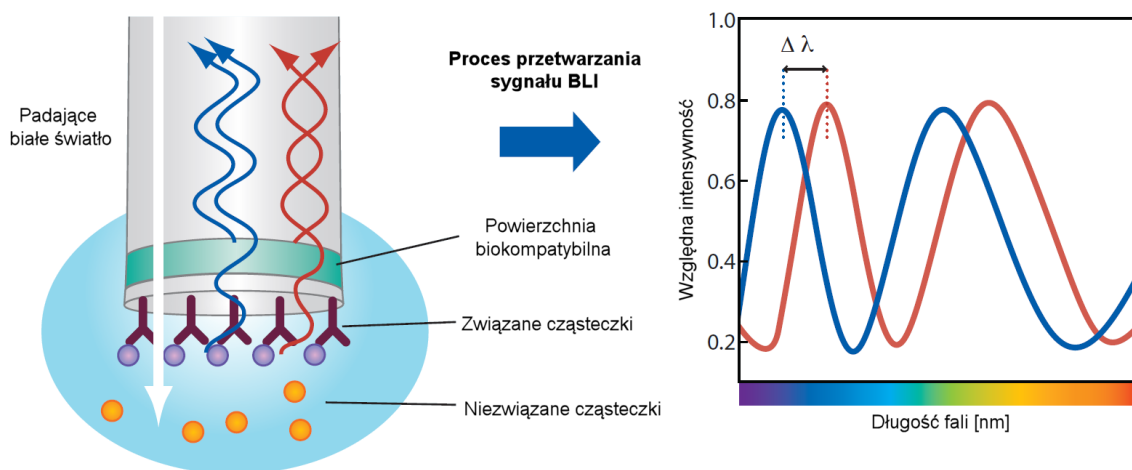
**Rys 36. Typowy eksperyment termoforezy.** Termoforetyczny ruch cząsteczki fluorescencyjnej w stanie „niezwiązany” (*unbounded*), zaznaczony kolorem czarnym, zmienia się po związaniu z niefluorescencyjnym ligandem (*bounded*) co pokazuje krzywa zaznaczona kolorem czerwonym (panel lewy). Na potrzeby analizy zmianę termoforezy wyraża się jako zmianę znormalizowanej fluorescencji ( $\Delta F_{\text{norm}}$ ), która jest zdefiniowana jako stosunek  $F_{\text{hot}}/F_{\text{cold}}$  (wartości  $F$  odpowiadają średnim wartościom fluorescencji między zdefiniowanymi obszarami zaznaczonymi odpowiednio czerwonymi i niebieskimi kursorami). Miareczkowanie niefluorescencyjnego ligandu powoduje stopniową zmianę termoforezy, która jest wykreślana jako zmiana fluorescencji normalizowanej ( $\Delta F_{\text{norm}}$ ) w celu uzyskania krzywej wiązania niezbędnej do określenia stałej dysocjacji wiązania ( $K_D$ ), (panel prawy) [190].

Serie kolejnych rozcieńczeń niefluorescencyjnego ligandu spowodowały stopniową zmianę termoforezy, która została wykreślona jako  $\Delta F_{\text{norm}}$  w celu uzyskania krzywej niezbędnej do wyliczenia stałej dysocjacji wiązania ( $K_D$ ) (Ryc. 36, panel prawy).

## 8.2. Interferometria bio-warstwowa BLI

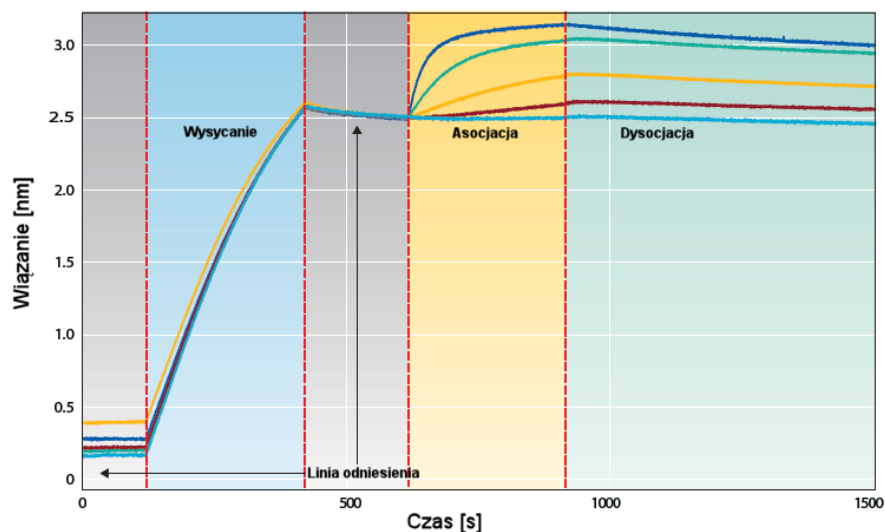
Interferometria bio-warstwowa (ang. *bio-layer interferometry*, BLI) to technologia pozwalająca na pomiar interakcji międzycząsteczkowych bez konieczności ich znakowania. Jest to optyczna technika analityczna, która pozwala na zarejestrowanie w czasie

rzeczywistym zmian interferencji światła białego odbitego od dwóch powierzchni: warstwy unieruchomionego białka na końcówce biosensora i wewnętrznej warstwy odniesienia. Imobilizowany na powierzchni biosensora ligand jest inkubowany w roztworze analitu. Wzajemne oddziaływanie ligandu i analitu powoduje zmianę grubości warstwy na powierzchni sensora, co skutkuje przesunięciem wzorca interferencji światła odbitego. Na podstawie przesunięcia długości fali w czasie wykreślane są tzw. krzywe kinetyczne, które umożliwiają analizę kinetyki interakcji międzycząsteczkowych (Ryc. 37).



**Ryc. 37. Schemat przetwarzania sygnału w metodzie interferometrii bio-warstwowej [191].**

Pomiar kinetyki reakcji badanych cząsteczek przebiegał w kilku etapach. Pierwszym etapem było równoważenie biosensora poprzez inkubację w buforze, mające na celu stabilizację początkowego sygnału. Następnie, w tzw. etapie ładowania, do powierzchni sensora przyłączany był ligand. W kolejnym kroku sensory przenoszono do studzienek z buforem w celu odpłukania niespecyficznie związanych cząsteczek. Na etapie asocjacji zachodziła właściwa interakcja liganda z analitem. Dysocjacja, czyli ostatni etap, obejmowała odłączenie analitu od cząsteczek immobilizowanego liganda (Ryc. 38).



**Ryc. 38. Sensogram przedstawiający poszczególne etapy eksperymentu przeprowadzonego z zastosowaniem techniki BLI [191].**

Kluczowymi parametrami kinetycznymi, których analizę umożliwia technika BLI są szybkość asocjacji ( $k_{on}$ ) oraz szybkość dysocjacji ( $k_{off}$ ). Szybkość asocjacji określa ilość kompleksów ligand-analit powstających w czasie 1 s przy użyciu 1-molarnego stężenia roztworu analitu. Szybkość dysocjacji określa stabilność powstałych kompleksów, poprzez dostarczenie informacji o ilości kompleksów ulegających dysocjacji w czasie 1 s. Wartość stałej powinowactwa ( $K_D$ ) jest ilorazem stałej asocjacji i stałej dysocjacji, wyrażanym w molach. Do jej obliczenia wykorzystywany jest następujący wzór:

$$K_D = \frac{k_{on}}{k_{off}}$$

Pomiary oddziaływania kompleksów ludzkich białek rybosomalnych z RTA metodą BLI wykonano wykorzystując urządzenie Octet96-RED (Pall ForteBio). W pierwszym etapie ustalono optymalne stężenie RTA niezbędne do wysycenia sensora. W tym celu płytkę 96-dołkową uzupełniono według następującego schematu: w dołkach od 1A do 1C umieszczono bufor do BLI (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>), natomiast dołki od 2A do 2C uzupełniono szeregiem dwukrotnych rozcieńczeń RTA w buforze do BLI (w zakresie od 0,06 mg/ml do 0,015 mg/ml). W dołkach od 3A do 3C umieszczono bufor do BLI z dodatkiem 0,01 % Tween-20, zaś w dołkach od 4A do 4C umieszczono preparat dimeru P1-P2 o stężeniu 1 μM w buforze do BLI z 0,01 % Tween-20. Końcowa objętość mieszanin reakcyjnych

w każdym dołku wynosiła 200  $\mu$ l. Przed pomiarami sensory poddano hydratacji, poprzez 10-minutową inkubację w buforze do BLI przy jednoczesnym wytrząsaniu przy 1000 rpm. Adekwatnie do powyższej procedury wykonano kolejne analizy z pozostałymi kompleksami. Optymalizacja stężenia cząsteczki RTA przebiegła w 5 etapach :

1. równoważenie sensora (60 s, dołki 1A-1C),
2. ładowanie RTA (10 s, dołki 2A-2C),
3. równoważenie sensora (50 s, 3A-3C),
4. asocjacja kompleksu białkowego (160 s, 4A- 4C),
5. dysocjacja (600 s, 3A-3C).

Bazując na uzyskanym sensogramie do dalszych badań wybrano stężenie 0,06 mg/ml RTA, które zapewniało optymalny poziom wysycenia biosensora ligandem.

Właściwą analizę interakcji RTA z kompleksami białek P1-P2 przeprowadzono na płytce 96-dołkowej, przy użyciu biosensora Ni-NTA, według następującego schematu:

- dołki od 1A do 1H uzupełniono buforem do BLI,
- dołki od 2A do 2H roztworem RTA o stężeniu 0,06 mg/ml,
- dołki od 3A do 3H buforem do BLI z dodatkiem 0,01 % Tween,
- dołki od 4A do 4H szeregiem siedmiu 2-krotnych rozcieńczeń odpowiedniego kompleksu białkowego z dodatkiem 0,01 % Tween, rozpoczynając od stężenia 900nM, kończąc na buforze do BLI z dodatkiem 0,01 % Tween,

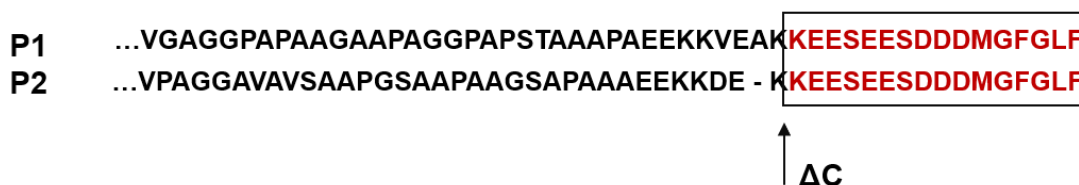
W analizie wykorzystano dwa rzędy biosensorów, przy czym drugi rząd miał charakter referencyjny, tj. etap ładowania sensorów ligandem zastąpiono inkubacją w buforze. Podobnie jak w przypadku optymalizacji stężenia cząsteczek RTA przed analizą wykonano hydratację sensora. Eksperyment składał się z następujących etapów:

1. równoważenie sensora (60 s, dołki 1A-1H),
2. ładowanie RTA (100 s, dołki 2A-2H),
3. równoważenie sensora (50 s, dołki 3A-3H),
4. asocjacja kompleksu białkowego (160 s, dołki 4A-4H),
5. dysocjacja (600 s, dołki 3A-3H),

Otrzymane krzywe analizowano przy użyciu programu Data Analysis v. 9.0. Do otrzymanych krzywych kinetycznych dopasowano matematyczny model wiązania odpowiadający interakcji w stosunku 1:1. Analizie poddano etap asocjacji i dysocjacji, stosując tzw. *global fitting*. Podczas analizy zastosowano podwójną referencję w celu odjęcia sygnału pochodzącego z buforu (studzienka referencyjna 4H) oraz od cząsteczek analitu niespecyficycznie wiążących się na powierzchni biosensora (sensory referencyjne). Do obliczenia parametrów kinetycznych wybrano krzywe o najlepszym dopasowaniu, czyli o najwyższym wskaźniku  $R^2$ .

## IV. WYNIKI

Przedmiotem badań w niniejszej rozprawie jest charakterystyka oddziaływań heterodimerów białek rybosomalnych P1-P2 z katalityczną podjednostką rycyny - RTA, a przede wszystkim określenie znaczenia konserwatywnego C-końcowego elementu białek P1-P2 w interakcji z RTA. W tym celu, wykorzystano przygotowane w Katedrze Biologii Molekularnej konstrukty genetyczne pozwalające na heterologiczną ekspresję ludzkich rybosomalnych białek P [184]; w zakresie prowadzonych prac badawczych przygotowano także dodatkowe konstrukty genetyczne pozwalające na heterologiczną ekspresję tzw. delecyjnych form białek P1 i P2, w których usunięto 16-cie C-terminalnych wysoce hydrofobowych reszt aminokwasowych, uważanych za funkcjonalny element bezpośrednio zaangażowany w rekrutację czynników zewnętrznych do rybosomu [99]. Białka oznaczono odpowiednio: P1<sub>ΔC</sub> - dla delecyjnej formy białka P1 oraz P2<sub>ΔC</sub> - dla delecyjnej formy białka P2 (Ryc. 39).

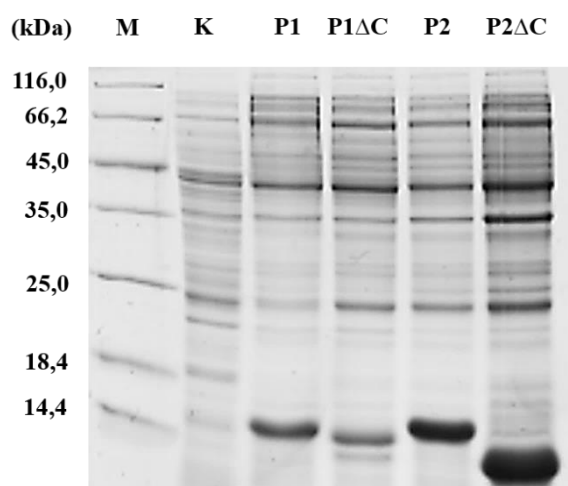


**Ryc. 39. Schemat przedstawiający zestawienie sekwencji aminokwasowych C-terminalnego fragmentu ludzkich białek P1 i P2.** Strzałką wskazano miejsce delecji dla 16 C-końcowych aminokwasów białka P1 oraz P2 (dodatkowo zaznaczonych kolorem czerwonym). Przygotowane konstrukty genetyczne pozwalały na heterologiczną ekspresję tzw. delecyjnych form białek P1 i P2, odpowiednio białek P1<sub>ΔC</sub> oraz P2<sub>ΔC</sub>. Kropkami oznaczono N-terminalny fragment białek P1 i P1 który został usunięty z zestawienia.

### 1. Heterologiczna ekspresja ludzkich białek rybosomalnych P1 i P2, ich form delecyjnych P1<sub>ΔC</sub> i P2<sub>ΔC</sub> oraz katalitycznej podjednostki rycyny - RTA

W celu otrzymania dimerów białek P1-P2, do późniejszej analizy interakcji z białkiem RTA, w pierwszym kroku podjęto prace oczyszczenia rekombinowanych białek P1, P2 oraz ich form delecyjnych. Przeprowadzono heterologiczną ekspresję konstruktów genetycznych z wykorzystaniem komórek *Escherichia coli*, wykorzystując szczep BL21(DE3). Komórki

*E. coli* transformowano konstrukcjami genetycznymi posiadającymi wprowadzone geny dla pełnych białek rybosomalnych P1 i P2 lub dla ich form delecyjnych P1 $\Delta$ C i P2 $\Delta$ C, a następnie przeprowadzono heterologiczną ekspresję w układzie bakteryjnym. System ekspresyjny opierał się na bazie operonu laktozowego, indukowanego chemicznie przy pomocy niehydrolizowanego analogu laktozy (ang. *Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*, IPTG). Wszystkie konstrukty genetyczne były przygotowane na bazie wektora pT7-7, który zawiera tzw. ‘silny’ promotor pochodzący z bakteriofaga T7, pozwalający na efektywną ekspresję genu, a tym samym wydajną syntezę białka rekombinowanego. W pierwszej kolejności, przeprowadzono weryfikację wydajności syntezy białek rekombinowanych przez komórki *E. coli* z wykorzystaniem analizy SDS-PAGE (Ryc. 40).

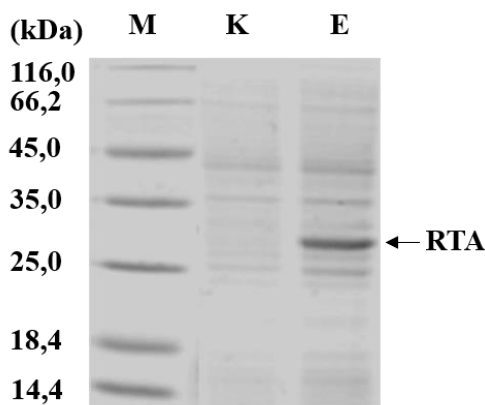


**Ryc. 40. Analiza SDS-PAGE frakcji białkowych otrzymanych w wyniku heterologicznej ekspresji genów dla pełnych oraz delecyjnych form ludzkich białek P1 i P2 w komórkach *E. coli*.** M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa, K – pełny ekstrakt komórkowy *E. coli* z wektorem kontrolnym nie posiadającym genów dla białek P1, P2 i ich form delecyjnych. P1 i P1 $\Delta$ C oraz P2 i P2 $\Delta$ C – ekstrakty komórkowe otrzymane z komórek *E. coli* prowadzących ekspresję białek P1 i P2 oraz form delecyjnych.

Przeprowadzona analiza SDS-PAGE wskazała, że we wszystkich analizowanych układach ekspresyjnych zanotowano wysoki poziom syntezy białek rekombinowanych P1, P2 oraz ich form delecyjnych (Ryc. 40) z dominującymi białkami o masach molekularnych odpowiadającym białkom P1 i P2 oraz formom delecyjnym. Tak opracowana heterologiczna ekspresja pozwoliła na podjęcie kolejnych kroków w celu oczyszczenia i przygotowania poszczególnych dimerów białek P1-P2 oraz pochodnych pozbawionych C-terminalnego elementu.



W zakresie prac weszło także przygotowanie katalitycznej podjednostki rycyny (RTA), co zostało przeprowadzone analogicznie do ekspresji ludzkich białek rybosomalnych, na drodze heterologicznej ekspresji genu dla białka RTA w komórkach szczepu *E. coli* BL21(DE3)RIL. Komórki bakteryjne transformowano konstruktem genetycznym opartym na wektorze ekspresyjny pET32 (a)+, umożliwiającym ekspresję białka RTA z etykietką histydynową, otrzymanym dzięki uprzejmości Prof. Nilgun Tumer (Department of Plant Biology and Pathology, School of Environmental and Biological Sciences, Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA). Analizę poziomu syntetyzowanego białka rekombinowanego wykonano na podstawie rozdziału elektroforetycznego frakcji białkowych z wykorzystaniem techniki SDS-PAGE (Ryc. 41).



**Ryc. 41. Analiza SDS-PAGE frakcji białkowych otrzymanych na drodze heterologicznej ekspresji genu dla katalitycznej podjednostki rycyny - RTA w komórkach *E. coli*.** M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa, K - ekstrakt komórkowy pochodzący z komórek *E. coli*, które nie zostały poddane indukcji ekspresji z zastosowaniem IPTG. E - ekstrakt komórkowy *E. coli* pozyskany z komórek prowadzących ekspresję RTA, indukowanych IPTG. Strzałką wskazano prążek białkowy o masie 32 kDa, odpowiadający masie molekularnej RTA z dołączoną etykietką histydynową.

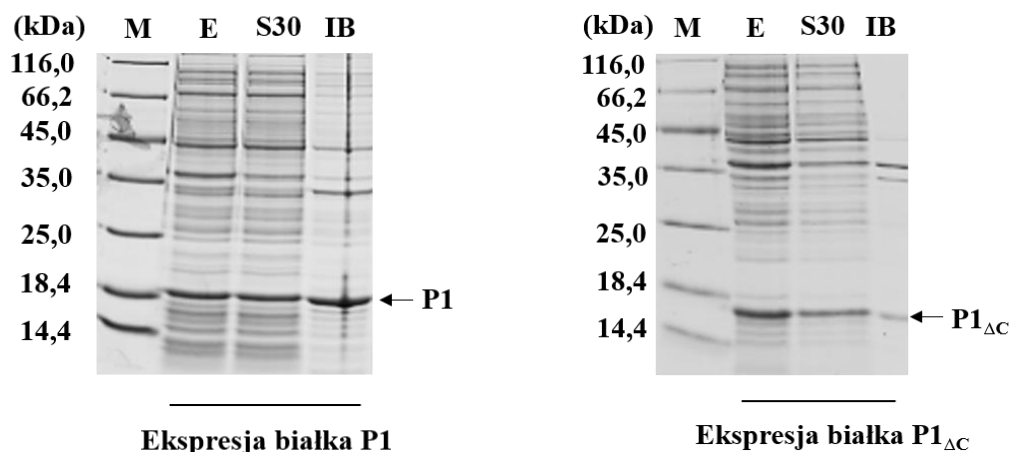
Analiza SDS-PAGE wykazała wysoki poziom ekspresji genu dla RTA w komórkach *E. coli*, czego wyrazem jest widoczny sygnał w formie prążka białkowego o masie 32 kDa, którego masa molekularna koresponduje do masy teoretycznej RTA kodowanego przez gen w obrębie wektora pET32 (a)+. Otrzymany preparat białkowy z uwagi na zanieczyszczenia pochodzące z organizmu gospodarza *E. coli* przeznaczono do dalszych etapów oczyszczania z wykorzystaniem technik chromatograficznych.

## **2. Oczyszczanie ludzkich białek rybosomalnych P1/P2, ich form delecyjnych P1 $\Delta$ C/ P2 $\Delta$ C oraz katalitycznej podjednostki rycyny**

Z uwagi na odmienne parametry biofizyczne białek P1/P1 $\Delta$ C i P2/P2 $\Delta$ C procesy oczyszczania białek rekombinowanych przebiegały dwutorowo, z wykorzystaniem odmiennych technik oraz metod chromatograficznych [184,187]. Grupa białek P1/P1 $\Delta$ C, wykazuje tendencję do oligomeryzacji, a tym samym tzw. rozpuszczalność białka P1 jest niska w środowisku wodnym, czego rezultatem jest lokalizowanie się białka P1 we frakcji białek nierozpuszczalnych. Z tego powodu białko to oczyszczano w warunkach denaturujących w oparciu o procedury ustalone dla drożdżowych białek P (patrz: Materiały i Metody) [187]. Białko P2 posiada odmienne parametry, czego rezultatem jest fakt, iż nie występuje jako tzw. nierozpuszczalne oligomery, a lokalizację się we frakcji białek rozpuszczalnych w środowisku wodnym, a tym samym proces oczyszczania był prowadzony w tzw. warunkach natywnych [187]. Podobnie białko RTA, z dołączoną etykietką histydynową (10xHisTag) jest białkiem które efektywnie ulega ekspresji w komórkach *E. coli* i także należy do tzw. grupy białek rozpuszczalnych, czego efektem jest lokalizacja we frakcji cytoplazmatycznej, rozpuszczalnej w środowisku wodnym. Umożliwiło to jego oczyszczenie w warunkach natywnych z wykorzystaniem metody chromatografii powinowactwa, stosując kolumnę niklową (Ni-NTA).

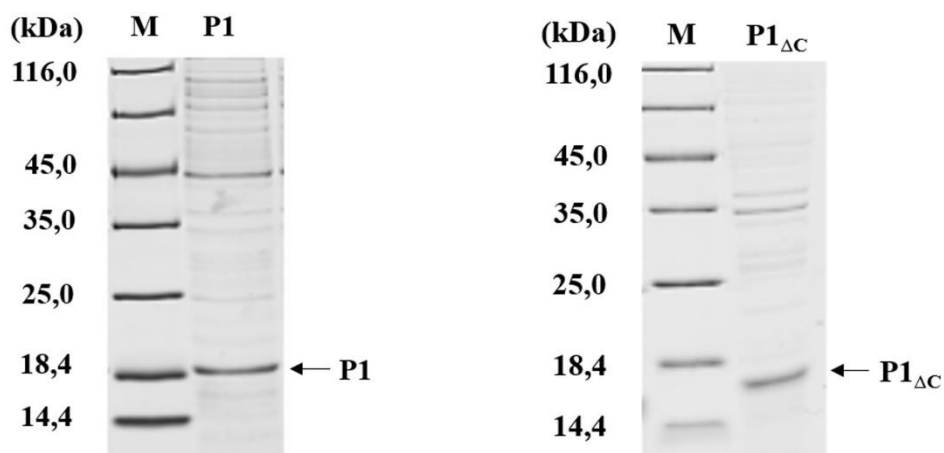
### **2.1. Oczyszczanie ludzkich rybosomalnych białek P1/P1 $\Delta$ C**

Po przeprowadzeniu heterologicznej ekspresji białek P1/P1 $\Delta$ C na skalę preparatywną, podjęto się oczyszczenia poszczególnych białek rekombinowanych. Komórki *E. coli* poddano dezintegracji, a następnie przeprowadzono frakcjonowanie na drodze wirowania różnicowego. W wyniku wykonanych działań otrzymano dwie zasadnicze frakcje białkowe, S30 - tzw. frakcja cytoplazmatyczna oraz frakcja IB (ang. *Inclusion Bodies*), która składa się z białek nierozpuszczalnych w środowisku zastosowanego buforu. Otrzymane frakcje białkowe poddano analizie SDS-PAGE w celu potwierdzenia lokalizacji białka rekombinowanego. Analiza wskazała, że białko P1 występuje w dwóch frakcjach, S30 oraz IB; podobny wynik zanotowano dla białka P1 $\Delta$ C (Ryc. 42).



**Ryc. 42. Analiza SDS-PAGE frakcji białkowych otrzymanych na drodze wirowania różnicowego zawierających pełne białko P1 oraz jego formę delecyjną.** Panel lewy: analiza frakcji białkowych zawierających białko P1. Panel prawy: analiza frakcji białkowych zawierających białko P1<sub>ΔC</sub>; M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa, E - ekstrakt komórkowy otrzymany po dezintegracji komórek *E. coli*, S30 - frakcja cytoplazmatyczna, IB - nierozpuszczalna frakcja tzw. ciałek inkluzyjnych (ang. *Inclusion Bodies*, IB). Strzałkami wskazano prążki białkowe o masach odpowiadających białkom P1 oraz P1<sub>ΔC</sub>.

Należy podkreślić, że uzyskane frakcje białkowe IB zawierały znaczną ilość białek P1 oraz P1<sub>ΔC</sub> i charakteryzowały się wysokim poziomem oczyszczenia białek rekombinowanych uzyskanym w wyniku wirowania różnicowego. Otrzymane frakcje białkowe IB posłużyły jako materiał wyjściowy do dalszych kroków, w celu przygotowania kompleksów białkowych zgodnie z procedurami ustalonymi w Katedrze Biologii Molekularnej procedury [184]. I tak, otrzymany preparat ciałek inkluzyjnych zawieszono w buforze denaturującym (6 M Gdn-HCl) w celu denaturacji chemicznej oligomerów białkowych. Analizę uzyskanego preparatu wykonano przy użyciu elektroforezy SDS-PAGE (Ryc. 43).



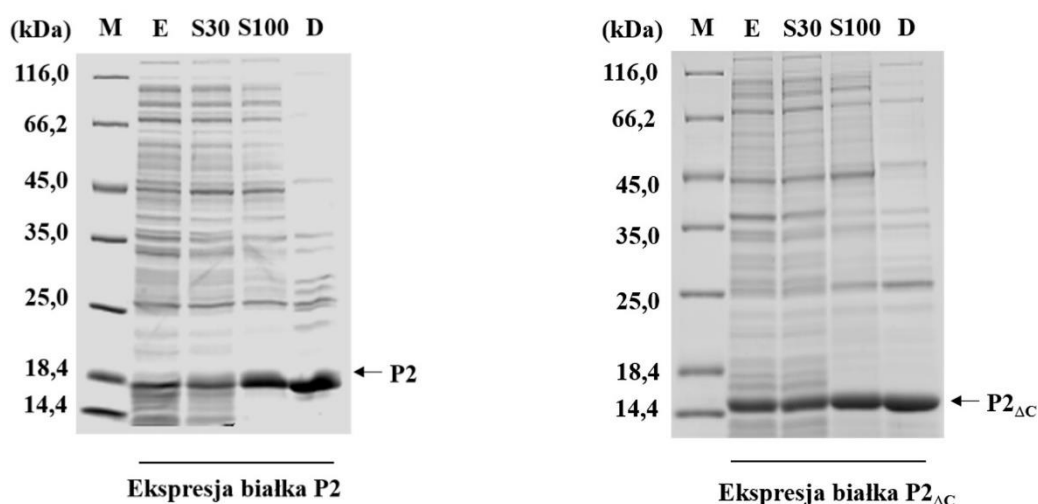
**Ryc. 43. Analiza SDS-PAGE preparatów uzyskanych w wyniku oczyszczania ludzkich białek P1/P1<sub>ΔC</sub>. Panel lewy:** oczyszczony preparat białka P1. **Panel prawy:** oczyszczony preparat białka P1<sub>ΔC</sub>. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa. Strzałkami wskazano prążki białkowe o masach odpowiadających białkom P1 oraz P1<sub>ΔC</sub>.

Uzyskane preparaty białkowe charakteryzowały się wysokim stopniem oczyszczenia jednakże z widocznymi wysokocząsteczkowymi zanieczyszczeniami pochodzącymi z organizmu *E. coli*. Przygotowane preparaty białek P1/P1<sub>ΔC</sub> przeznaczono do dalszych procedur formowania poszczególnych dimerów białkowych.

## 2.2 Oczyszczanie ludzkich rybosomalnych białek P2/P2<sub>ΔC</sub>

W celu oczyszczenia białek rekombinowanych P2 oraz P2<sub>ΔC</sub>, przeprowadzono heterologiczną ekspresję na skalę preparatywną; otrzymane komórki *E. coli* poddano dezintegracji z wykorzystaniem ultradźwięków. Następnie uzyskany ekstrakt komórkowy frakcjonowano na drodze wirowania różnicowego. Białko P2, z racji na swoje parametry biofizyczne, zachowuje się odmiennie w stosunku do białka P1 i nie formuje nierozpuszczalnych oligomerów, a tym samym występuje we frakcji białek cytoplazmatycznych [187]. W wyniku wykonanych działań otrzymano frakcję białkową S30, zawierającą rozpuszczalne białka cytoplazmatyczne. Frakcję tą wykorzystano do dalszych etapów oczyszczania. W kolejnym kroku frakcję S30 traktowano niejonowym związkiem powierzchniowo czynnym Triton X-100, w celu rozbicia ewentualnych struktur zawierających membrany lipidowe. Tak przygotowaną frakcję białkową poddano

ultrawiroowaniu, w wyniku którego otrzymano frakcję pozbawioną nano-struktur (takich jak na przykład rybosomów), tzw. frakcję postrybosomalną S100, co pozwoliło na usunięcie znacznej ilości tzw. białek balastowych w formie białek rybosomalnych, w celu usprawnienia procedury oczyszczania białka rekombinowanego. W kolejnym kroku otrzymaną frakcję S100 poddano procedurze ekstrakcji etanolowej, co jest unikalnym krokiem oczyszczania, ponieważ białko P2 posiada pI w zakresie pH 3-4, a tym samym jest niewrażliwe na wysokie stężenie etanolu i pozostaje rozpuszczalne nawet w 50% roztworze etanolu, zaś pozostałe białka bakteryjne ulegają wytrąceniu z frakcji S100. Uzyskane w wyniku poszczególnych etapów oczyszczania frakcje białkowe analizowano na żelu poliakrylamidowy metodą SDS-PAGE w celu oceny efektywności procedury oczyszczania (Ryc. 44).

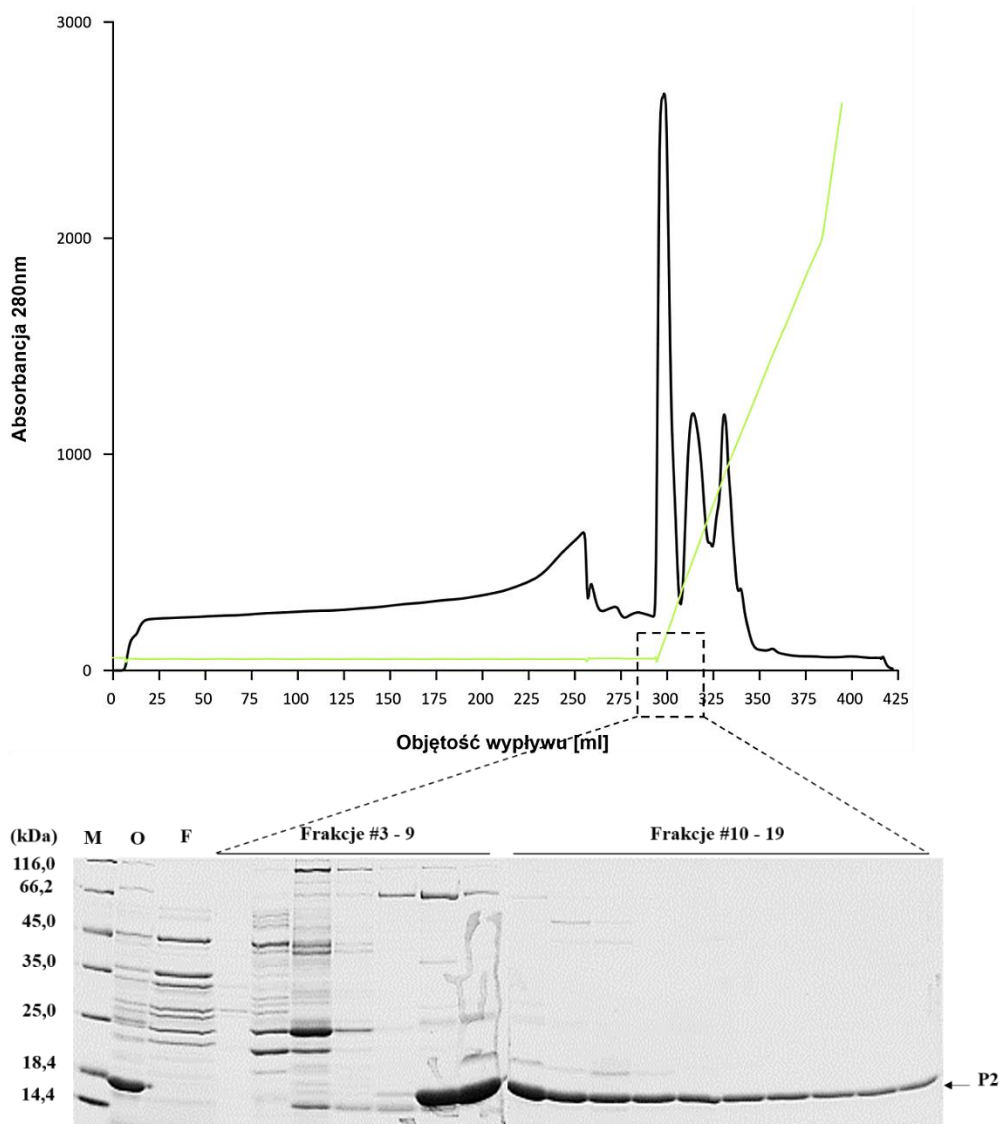


**Ryc. 44. Analiza SDS-PAGE frakcji białkowych zawierających pełne białko P2 oraz jego formę delecyjną.** Poszczególne frakcje białkowe otrzymano na drodze wirowania różnicowego, ultrawiroowania oraz ekstrakcji etanolowej. Panel lewy: analiza frakcji białkowych zawierających białko P2. Panel prawy: analiza frakcji białkowych zawierających białko P2<sub>ΔC</sub>; M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa, E - ekstrakt komórkowy otrzymany po dezintegracji komórek *E. coli*, S30 - frakcja cytoplazmatyczna, S100 - frakcja cytoplazmatyczna pozbawiona rybosomów, tzw. frakcja postrybosomalna, D - frakcja zawierająca białka P po ekstrakcji etanolowej. Strzałkami wskazano prążki białkowe o masach odpowiadających białkom P2 oraz P2<sub>ΔC</sub>.

Przeprowadzone poszczególne kroki oczyszczania wskazały, że białko P2, jak i jego forma delecyjna P2<sub>ΔC</sub> przede wszystkim znajdują się we frakcji białek rozpuszczalnych. Ponadto, proces wirowaniu różnicowego jak i ekstrakcja etanolowa pozwoliły na usunięcie znacznej ilości białek bakteryjnych (Rys. 44). Tak uzyskany preparat charakteryzował się wysokim stopniem oczyszczenia białek rekombinowanych, jednakże z widocznymi

zanieczyszczeniami pochodzącymi z organizmu gospodarza *E. coli*. W związku z tym frakcja ta została poddana dalszym etapom oczyszczania.

Otrzymane preparaty białkowe poddano procedurze oczyszczania w warunkach natywnych, wykorzystując do tego celu chromatografię jonowymienną z użyciem kolumny Resource-Q w systemie FPLC. Wykorzystana kolumna Resource-Q posiadała złożę będące monodispersyjnym nośnikiem polistyrenu/diwinylobenzenu z grupą aminową jako ligandem. Kolumna Resource-Q, jako anionit, była w stanie wiązać białka o ładunku ujemnym. W oparciu o właściwości biofizyczne białka P2, posiadającego *pI* w zakresie niskiego pH, przy zastosowaniu środowiska buforującego o pH 7,5, uzyskano cząsteczki białek P2 o wypadkowym ładunku ujemnym, co pozwoliło na zastosowanie chromatografii jonowymiennej opartej o kolumnę wypełnioną anionitem. W konsekwencji, preparatyka wykonana z wykorzystaniem kolumny Resource-Q umożliwiła efektywne związanie białka P2 do złoża chromatograficznego. Zaadsorbowane na złożu białko P2 zostało uwolnione z kolumny chromatograficznej z wykorzystaniem gradientu stężenia NaCl (Ryc. 45), co zapewniło selektywne uwolnienie szeregu białek z kolumny, z jednoczesnym odseparowaniem białka rekombinowanego. Preparaty białkowe poszczególnych frakcji poddano analizie metodą SDS-PAGE (Ryc. 45). Białko rekombinowane P2 zostało uwolnione ze złoża w zakresie frakcji #8-19.

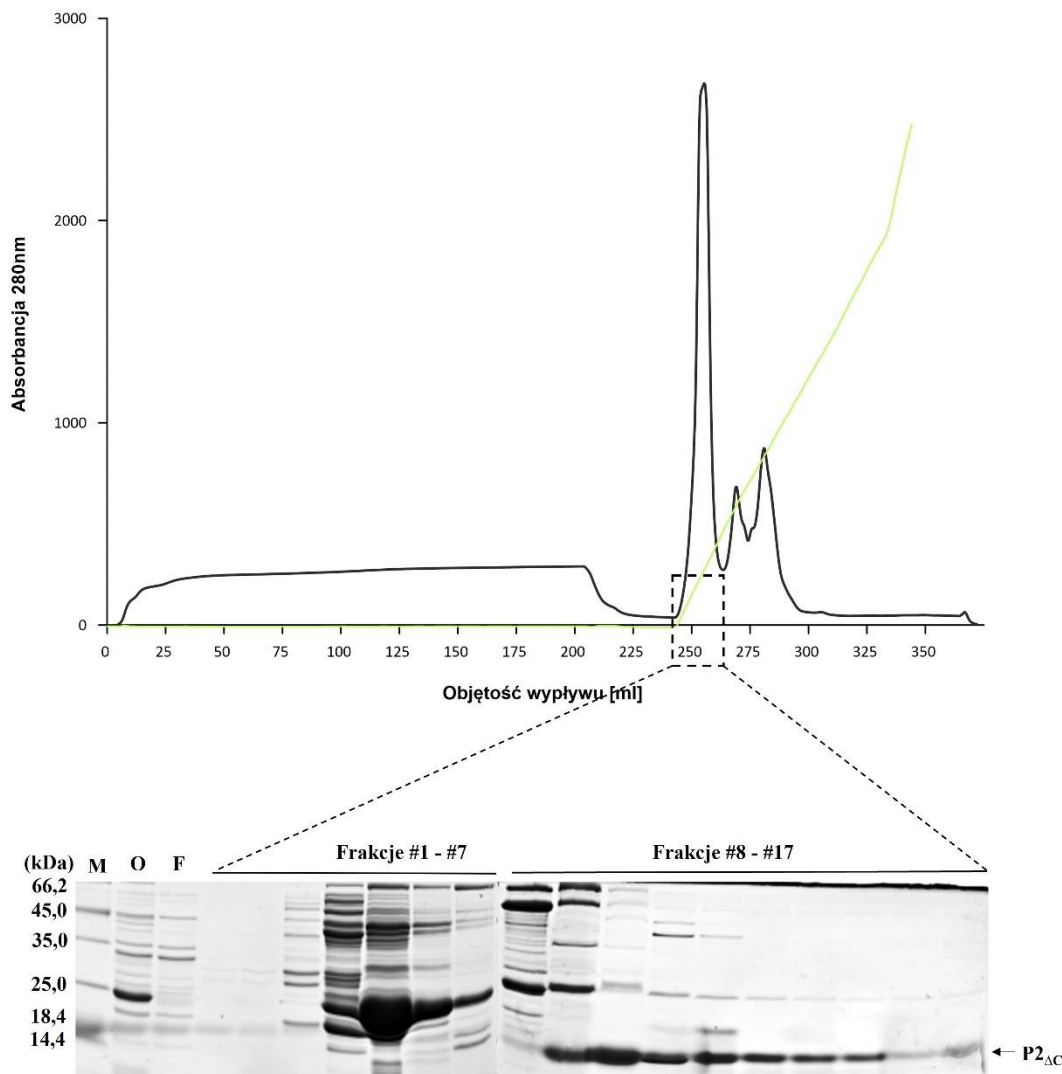


**Ryc. 45. Oczyszczanie białka P2 z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej z zastosowaniem kolumny chromatograficznej Resource Q.** Panel górny: Chromatogram otrzymany w wyniku rozdzielenia frakcji białek zawierającej białko P2. Kolorem zielonym zaznaczono gradient stężeń roztworu chlorku sodu (NaCl), użytego jako eluent. **Panel dolny:** analiza SDS-PAGE uzyskanych frakcji. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa; O – preparat białkowy nanoszony na kolumnę; F – frakcje białkowe nie związane z nośnikiem chromatograficznym; frakcje #3-19 – frakcje białkowe uzyskane w procesie elucji za pośrednictwem gradientu stężeń NaCl z kolumny chromatograficznej. Strzałką wskazano prążki białkowe o masie odpowiadającej białku P2.

Analogicznie, formę delecyjną białka P2 - P2<sub>ΔC</sub> poddano oczyszczaniu zgodnie z protokołem dla białka P2. Otrzymaną na drodze ekstrakcji etanolowej frakcję zawierającą białko P2<sub>ΔC</sub> oczyszczano w warunkach natywnych, wykorzystując do tego celu chromatografię jonowymienną z użyciem kolumny Resource-Q w systemie FPLC. Podobnie jak w przypadku oczyszczania białka P2, jego forma delecyjna charakteryzowała się

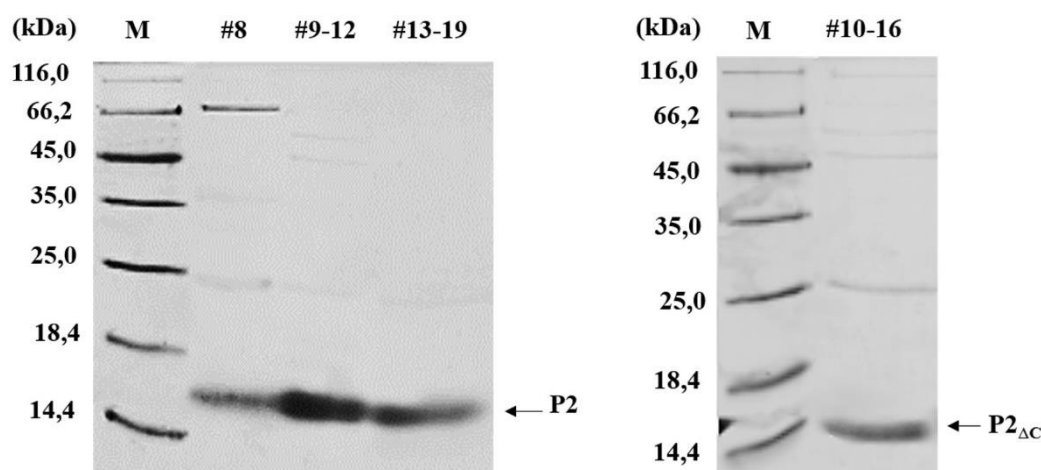


podobnymi właściwościami biofizycznymi, dzięki którym także ulegała efektywnemu wiązaniu się do złoża chromatograficznego i była uwolniona przy pomocy gradientu stężenia NaCl, wypływając z kolumny w zakresie frakcji #9-17. Podobnie jak w przypadku białka P2 preparaty poszczególnych frakcji białka P2<sub>ΔC</sub> poddano analizie metodą SDS-PAGE (Ryc. 46).



**Ryc. 46. Oczyszczanie białka P2<sub>ΔC</sub> z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej z zastosowaniem kolumny chromatograficznej Resource Q.** Panel górny: Chromatogram otrzymany w wyniku rozdziału frakcji białek zawierającej białko P2<sub>ΔC</sub>. Kolorem zielonym zaznaczono gradient stężeń roztworu chlorku sodu (NaCl), użytego jako eluent. **Panel dolny:** analiza SDS-PAGE uzyskanych frakcji. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa; O – preparat białkowy nanoszony na kolumnę; F – frakcje białkowe nie związane z nośnikiem chromatograficznym; frakcje #1-17 – frakcje białkowe uzyskane w procesie elucji za pośrednictwem gradientu stężeń NaCl z kolumny chromatograficznej. Strzałką wskazano prążki białkowe o masie odpowiadającej białku P2<sub>ΔC</sub>.

Na podstawie chromatogramów uzyskanych z chromatografii FPLC białek P2/P2 $\Delta$ C oraz analiz SDS-PAGE poszczególnych frakcji chromatograficznych, oceniono homogenność frakcji białkowych, które zawierały rekombinowane białka. Otrzymana frakcja białkowa zawierała białko P2 o wysokim stopniu homogenności (Ryc. 45, Panel dolny), zaś w przypadku białka P2 $\Delta$ C, otrzymano szereg frakcji które charakteryzowały się różnym poziomem zanieczyszczeń (Ryc. 46, Panel dolny). W konsekwencji, na podstawie analizy SDS-PAGE, wybrano frakcje o najwyższym poziomie oczyszczenia. W przypadku preparatu białka P2 uzyskano trzy preparaty zawierające frakcje #8, #9-12 oraz #13-19. Na preparat białka P2 $\Delta$ C składały się frakcje #10-16. Uzyskane preparaty białka P2 oraz P2 $\Delta$ C poddano analizie SDS PAGE w celu weryfikacji składu białkowego otrzymanych frakcji (Ryc. 47).

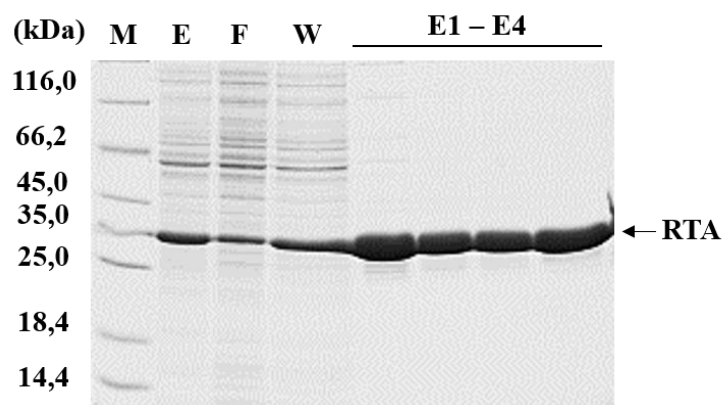


**Ryc. 47. Analiza SDS-PAGE preparatów białkowych otrzymanych w wyniku procedury oczyszczania z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej. Panel lewy:** frakcje białkowe uzyskane w wyniku połączenia frakcji chromatograficznych #8, #9-12 i #13-19 zawierające rekombinowane białko P2. **Panel prawy:** frakcja białkowa uzyskana w wyniku połączenia frakcji chromatograficznych #10-16 zawierająca oczyszczone białka P2 $\Delta$ C. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa. Strzałkami wskazano prążki białkowe o masach odpowiadających białku P2 oraz P2 $\Delta$ C.

Otrzymane preparaty białkowe o stężeniu ok. 2 mg/ml, zawierające odpowiednio białko P2 i P2 $\Delta$ C, zostały zabezpieczone poprzez zamrożenie poszczególnych frakcji w ciekłym azocie, a następnie przechowywano je w temperaturze -80 °C. Preparaty białkowe posłużyły w dalszych krokach do otrzymania dimerów rybosomalnych białek P1-P2 oraz ich form delecyjnych.

### 2.3 Oczyszczanie katalitycznej podjednostki rycyny – RTA

W celu otrzymania rekombinowanego białka RTA wykorzystano konstrukt genetyczny uzyskany od prof. Nilgun Tumer z Department (Department of Plant Biology and Pathology, School of Environmental and Biological Sciences, Rutgers University, New Brunswick, USA). Konstrukt genetyczny wykorzystywał wektor ekspresyjny pET32 (a) +, będący wektorem wykorzystywanym do heterologicznej ekspresji białek fuzyjnych zawierających sekwencje His- bądź S-Tag. Ekspresja białek odbywa się pod kontrolą promotora faga T7. Z uwagi na obecność dołączonej w obrębie genu dla RTA sekwencji DNA kodującej etykietkę 10xHis, procedura oczyszczania polegała na wykorzystaniu chromatografii powinowactwa na złożu zawierającym jony niklu. W tym celu komórki ekspresyjne *E. coli* prowadzące heterologiczną ekspresję białka RTA dezintegrowano z wykorzystaniem ultradźwięków, a następnie poddawano wirowaniu różnicowemu w celu usunięcia fragmentów komórek bakteryjnych jak i oligomerów białkowych. Uzyskaną frakcję białkową zawierającą ekspymowane białko nanoszono na kolumnę chromatograficzną zawierającą złożo zawierające zaadsorbowane jony niklu (Ni-NTA). W procesie chromatografii powinowactwa wykorzystano selektywne wiązanie się zestawu 10 reszt histydynowych do jonów niklu. Złożo Ni-NTA inkubowano z frakcją białkową w celu adsorpcji białko RTA do złoża, a następnie usunięto niespecyficznie związane białka na drodze płukania złoża. Wykorzystując bufor zawierającego imidazol uwolniono z kolumny specyficzne zaadsorbowane białka RTA. W wyniku działania imidazolu otrzymano szereg frakcji białkowych zawierających RTA. Preparaty oczyszczonego białka RTA weryfikowano na żelu poliakrylamidowym z wykorzystaniem elektroforezy SDS-PAGE (Ryc. 48). W procesie oczyszczania otrzymano ok. 2 mg białka.



**Ryc. 48. Oczyszczanie rekombinowanego RTA na drodze chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem złoża Ni-NTA.** Analiza SDS-PAGE frakcji białkowych poddanych chromatografii powinowactwa. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa; E – ekstrakt białkowy otrzymany po dezintegracji komórek *E. coli* nanoszony na kolumnę zawierającą złożo Ni-NTA; F – frakcja białek, które nie związały się z nośnikiem; W - frakcja białkowa otrzymana w procesie płukania kolumny chromatograficznej ze złożem Ni-NTA; E1-E4 – frakcje białkowe uzyskane w procesie płukania kolumny chromatograficznej buforem zawierającym imidazol, w celu uwolnienia białka zaadsorbowanego na złożu. Strzałką wskazano prążki białkowe o masie odpowiadającej białku RTA.

W wyniku przeprowadzenia procedury oczyszczania białka RTA na drodze chromatografii powinowactwa uzyskano preparaty białkowe RTA o wysokim stopniu oczyszczenia. Otrzymane frakcje (E1-E4) połączono, a następnie poddano dializie w celu usunięcia imidazolu z buforu; tak przygotowany preparat RTA zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz.

### 3. Otrzymywanie dimerów ludzkich białek P

Rybosomalne białka P1, P2 występują w formie dimerów na rybosomie eukariotycznym, a zatem ich natywną formą jest forma dimeryczna, jak wykazały wcześniejsze badania wykonane w Katedrze Biologii Molekularnej [106]. Indywidualne rekombinowane białka P1/P2 oraz ich formy delecyjne, występując w formie wolnej w roztworze ulegają niepoprawnemu procesowi fałdowania; jak wykazano we wcześniejszych badaniach, przyjmując strukturę tzw. „molten globule” [109,192,193]. Białko z grupy P1, przy braku naturalnego partnera białkowego, wykazywało tendencję do tworzenia nierozpuszczalnych oligomerów, a grupa białek P2 spontanicznie formowała specyficzne, rozpuszczalne

w środowisku wodnym homodimery [110]. Jak wykazano, w celu otrzymania dimerów białek P1-P2 konieczne jest zdenaturowanie obu białek, gdyż indywidualne białka P1 i P2 będąc w formie niepoprawnie sfałdowanej nie są zdolne do utworzenia heterodimeru [108]. W związku z tym wykorzystano procedurę formowania dimerów białkowych wykorzystując proces ich wspólnej renaturacji czego efektem jest poprawnie sfałdowany, funkcjonalny kompleks białkowy. W procedurze wykorzystano zjawisko denaturacji białka pod wpływem czynnika chemicznego (chlorowodorek guanidyny). Następnie białka poddano renaturacji po zmianie środowiska buforu i usunięciu czynnika denaturującego, co skutkowało spontanicznym fałdowaniem białek do natywnej struktury. Formowanie dimerów białek P1-P2 przeprowadzono na zasadzie połączenia poszczególnych preparatów białkowych zawierających indywidualne białka P1 i P2 oraz ich delecyjnych wariantów strukturalnych P1<sub>ΔC</sub>/P2<sub>ΔC</sub>. Formowanie heterodimerów przeprowadzono w następujących konfiguracjach:

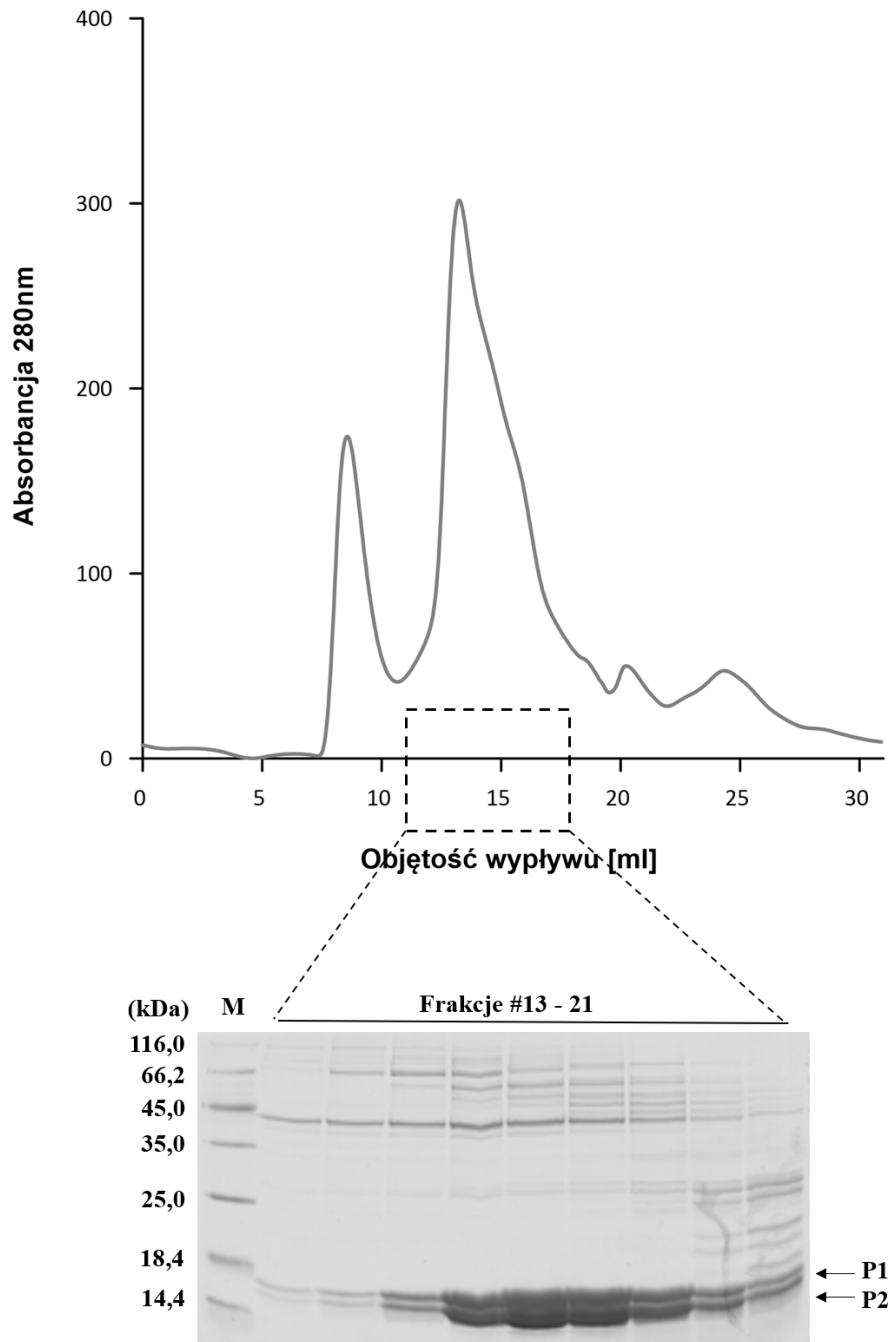
- P1<sub>ΔC</sub>-P2, w którym białko P1 jest pozbawione ostatnich 16 aminokwasów C-końca,
- P1-P2<sub>ΔC</sub>, w którym białko P2 jest pozbawione ostatnich 16 aminokwasów C-końca,
- P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>, w którym oba białka kompleksu są pozbawione 16-aminokwasowego odcinka domen CTD,
- P1-P2, hetero dimer zawierający pełne białka P1 i P2,

Ponadto do analiz wykorzystano spontanicznie formujące się homodimery:

- P2-P2 dimer utworzony w oparciu o tendencję białek P2 do spontanicznego tworzenia układu homodimerycznego, który jest stabilny strukturalnie w roztworze wodnym,
- P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>, analogicznie jak w przypadku P2-P2, tworzący spontanicznie w roztworze wodnym układ homodimeryczny, w którym oba białka kompleksu są pozbawione 16-aminokwasowego odcinka domen CTD.

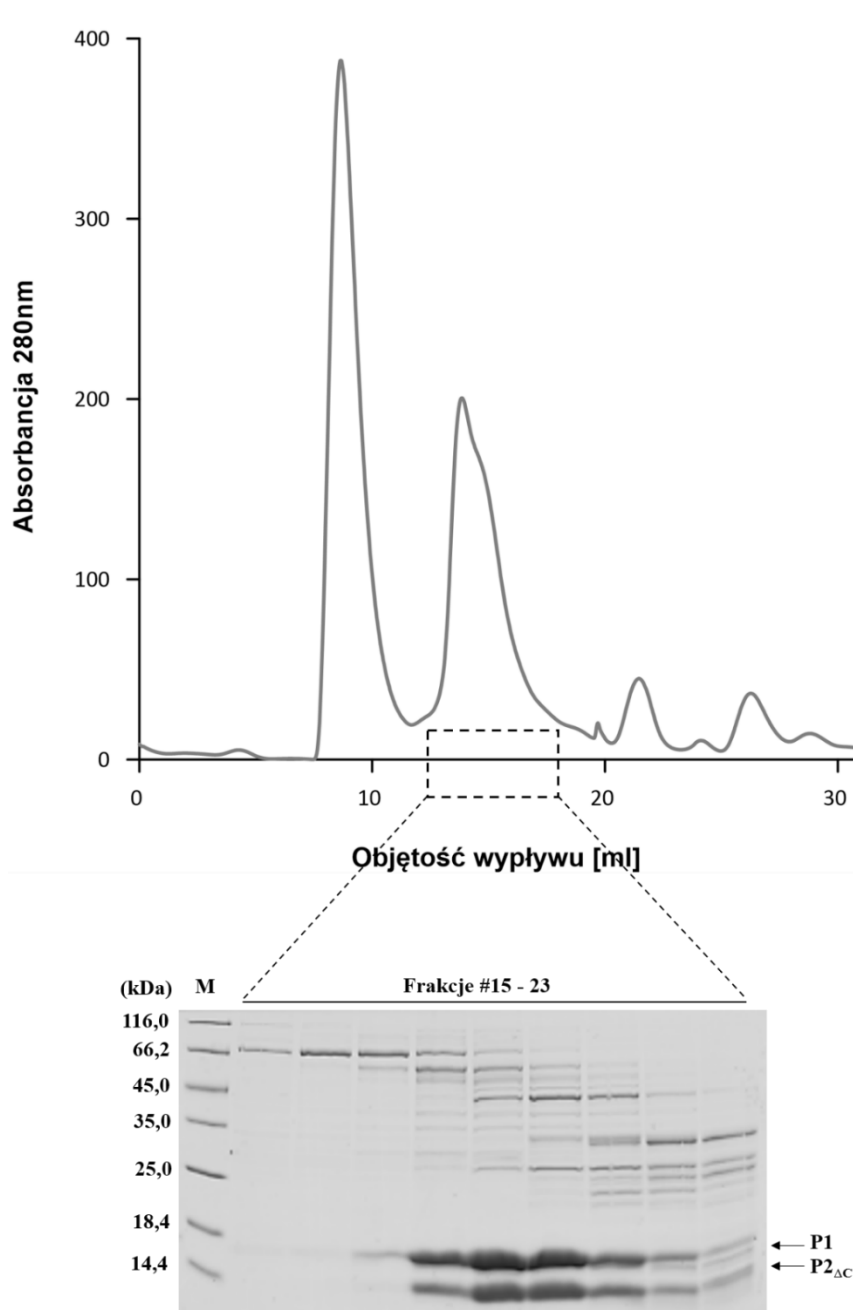
Jak opisano powyżej, kompleksy białkowe P1-P2 formowano w oparciu o procedurę denaturacji i renaturacji opracowaną w Katedrze Biologii Molekularnej [106,109]. Jednym z kluczowych elementów w formowaniu dimerów był odpowiedni stosunek ilościowy poszczególnych komponentów, tak aby zapobiec spontanicznemu i jednocześnie niepożądanemu powstawaniu homodimerów P2-P2 i P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>. W tym celu białka P1 i P2 łączono w stosunku molowym odpowiednio 3:1. Taka zależność jest związana z faktem, iż zwiększenie ilości wykorzystanego do formowania kompleksów białka P1 było konieczne, w celu zagwarantowania wystarczającej ilości białka P1 dla białka P2, co skutkowało

otrzymaniem homogennej mieszaniny heterodimerów P1-P2, poprzez całkowite związanie białka P2 do P1. Zastosowany nadmiar białka P1 związany był z jego właściwościami biofizycznymi – białko P1 wykazuje tendencję do oligomeryzacji, a kompleksy te są nierozpuszczalne w środowisku wodnym i łatwo je usunąć na drodze wirowania czy sączenia molekularnego. W konsekwencji, po cyklu denaturacji i renaturacji zakończonych dializą frakcji białkowych do buforu renaturacyjnego, uzyskane preparaty białkowe poddawano oczyszczaniu metodą sączenia molekularnego (ang. *size exclusion chromatography*, SEC) wykorzystując wysokorozdzielczy system FPLC. Chromatografię SEC przeprowadzono wykorzystując kolumnę chromatograficzną Superose HR 10/30. W celu monitorowania procesu oczyszczania poszczególnych dimerów za pośrednictwem SEC, uzyskane w wyniku chromatografii SEC frakcje białkowe, wybrane na podstawie obrazu chromatogramu, analizowano metodą SDS-PAGE (Ryc. 49-54).

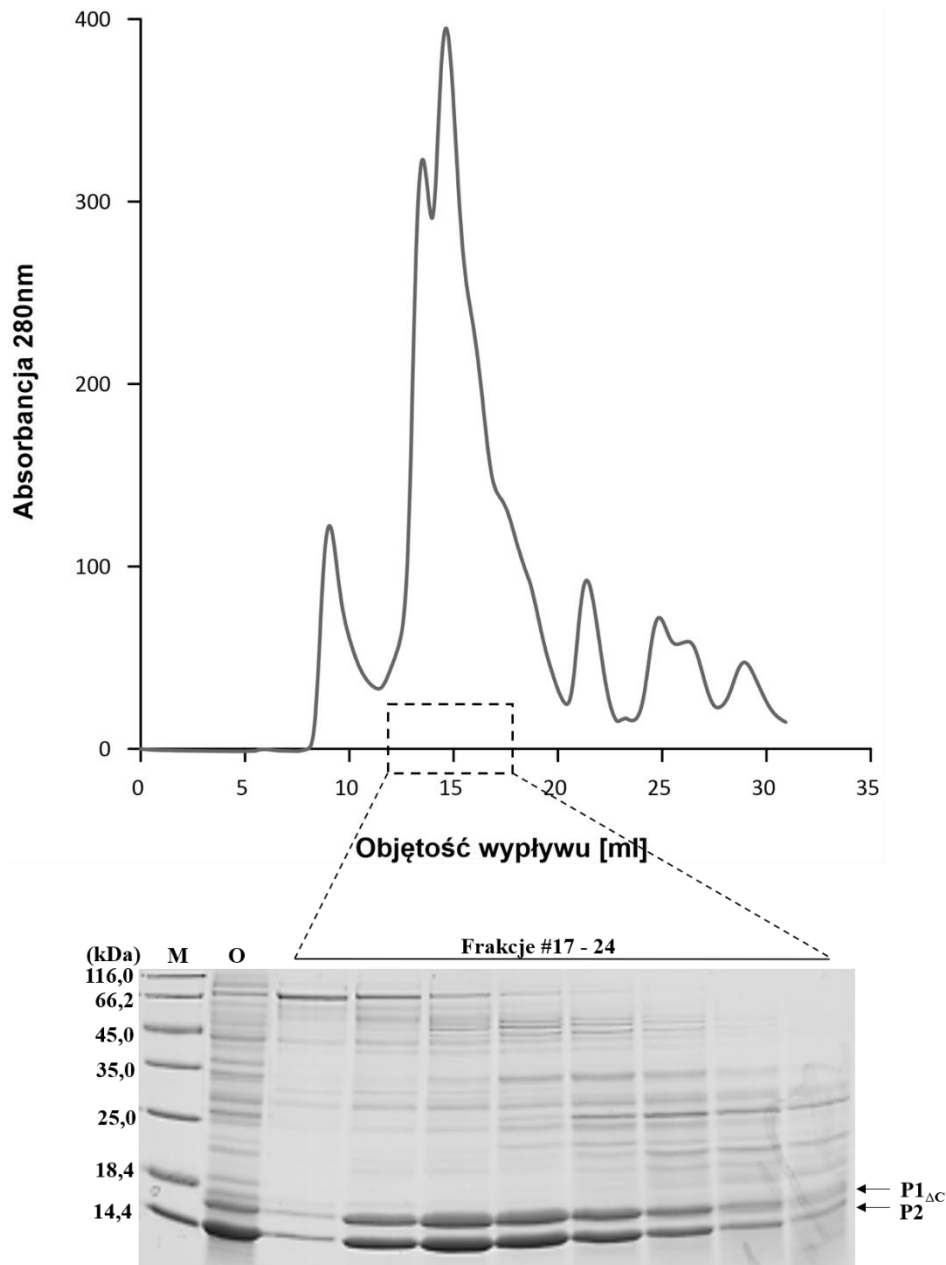


**Ryc. 49. Oczyszczanie kompleksu białek P1-P2 z wykorzystaniem chromatografii sączenia molekularnego.** Panel górny: Chromatogram pokazujący proces rozdziału frakcji białkowej zawierającej heterodimer P1-P2. Przedstawiona krzywa opisuje gęstość optyczną frakcji białkowych podczas chromatografii monitorowaną przy długości fali 280 nm. Panel dolny: analiza SDS-PAGE wybranych frakcji białkowych uzyskanych w wyniku rozdziału chromatograficznego kompleksu białek P1-P2 na drodze SEC. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa; frakcje #13-21 - frakcje uzyskane w procesie oczyszczania dimeru, zawierające białka P1-P2. Strzałką wskazano prążki białkowe o masie odpowiadającej białkom P1 i P2.

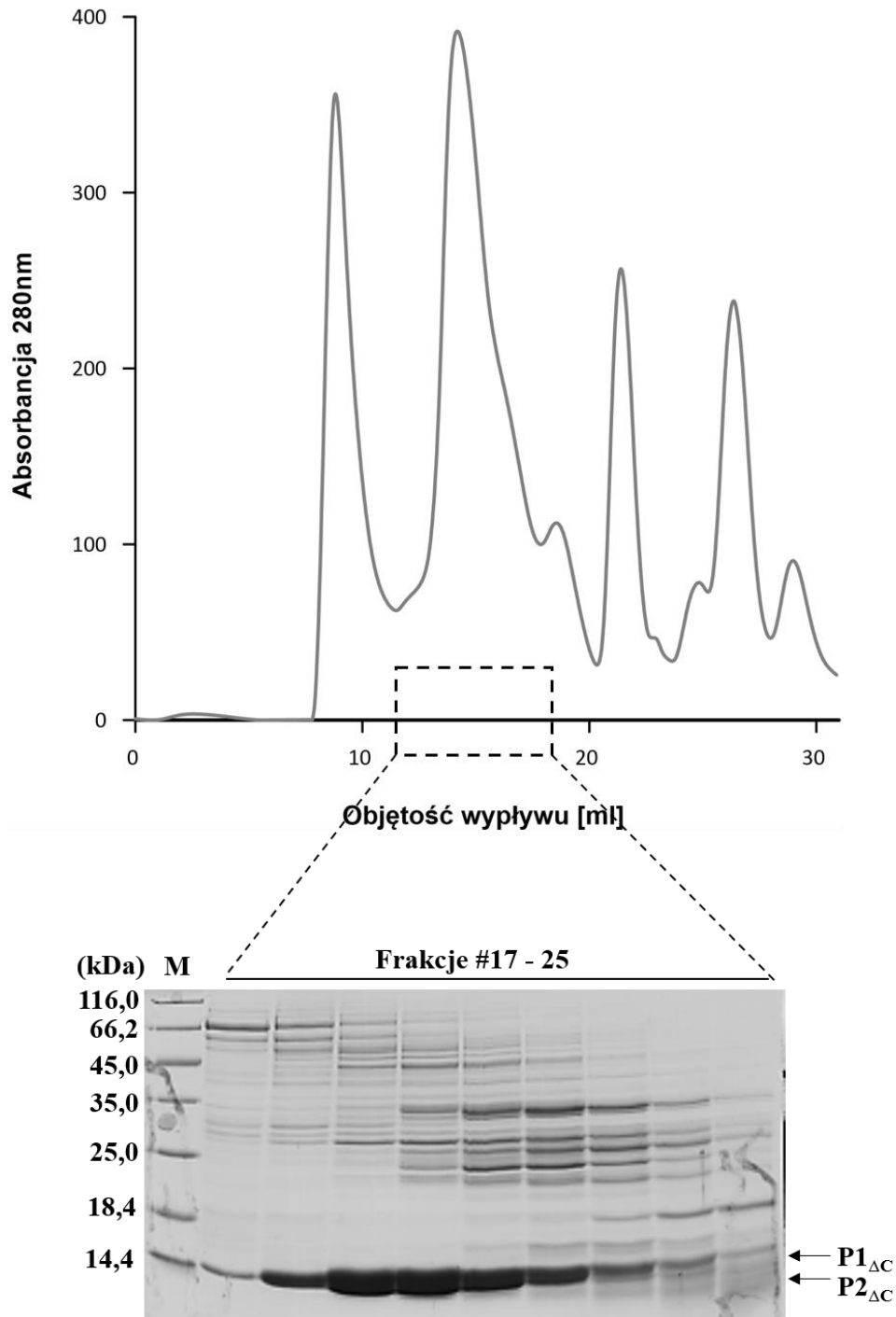




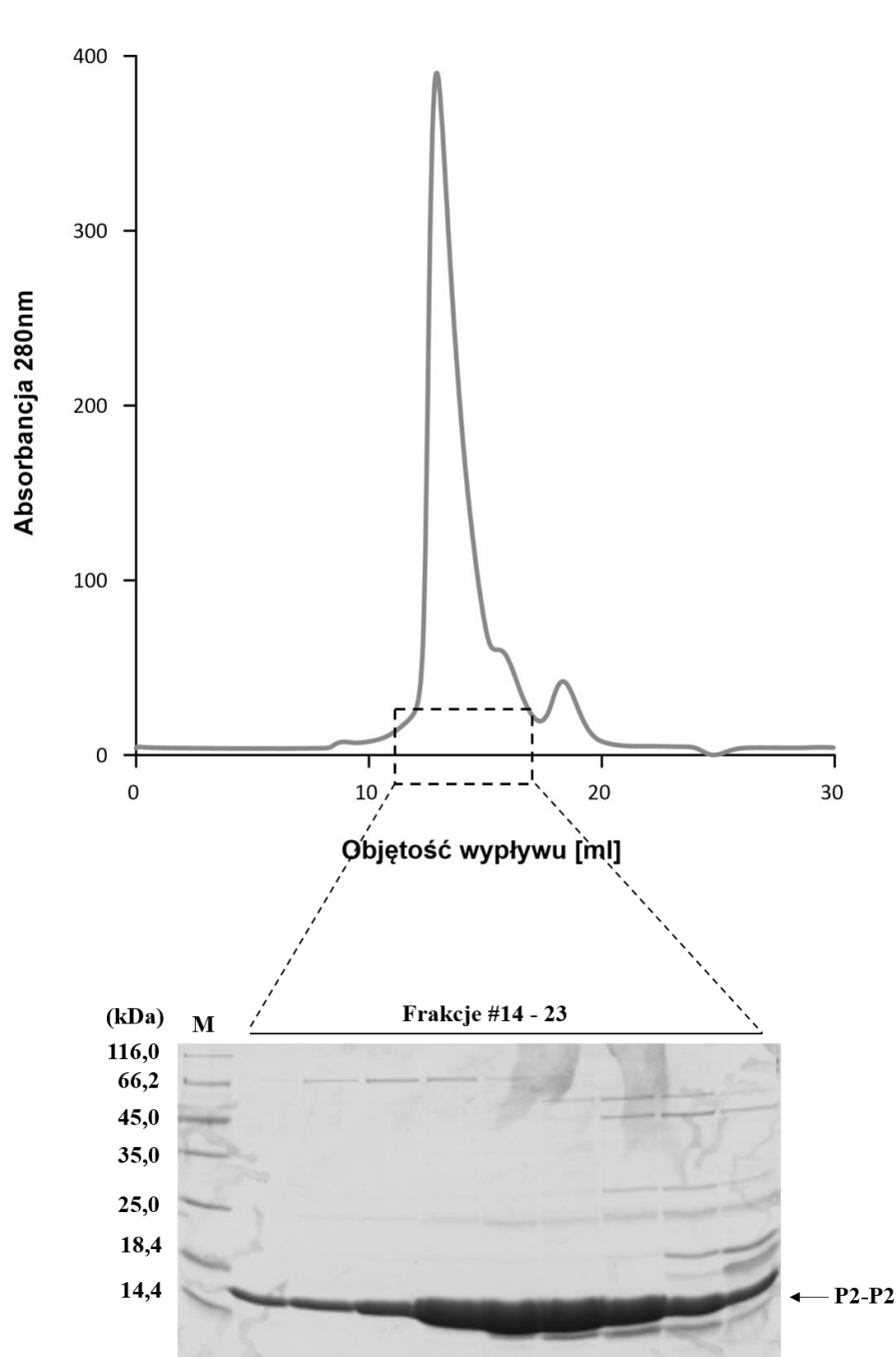
**Ryc. 50. Oczyszczanie kompleksu białek P1-P2<sub>ΔC</sub> z wykorzystaniem chromatografii sączenia molekularnego. Panel górny:** Chromatogram pokazujący proces rozdziału heterodimeru P1-P2<sub>ΔC</sub>. Przedstawiona krzywa opisuje gęstość optyczną frakcji białkowych podczas chromatografii monitorowaną przy długości fali 280 nm. **Panel dolny:** analiza SDS-PAGE wybranych frakcji białkowych uzyskanych w wyniku rozdziału chromatograficznego kompleksu białek P1-P2<sub>ΔC</sub> na drodze SEC. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa; frakcje #15-23 - frakcje uzyskane w procesie oczyszczania dimeru, zawierające białka P1-P2<sub>ΔC</sub>. Strzałką wskazano prążki białkowe o masie odpowiadającej białkom P1 i P2<sub>ΔC</sub>.



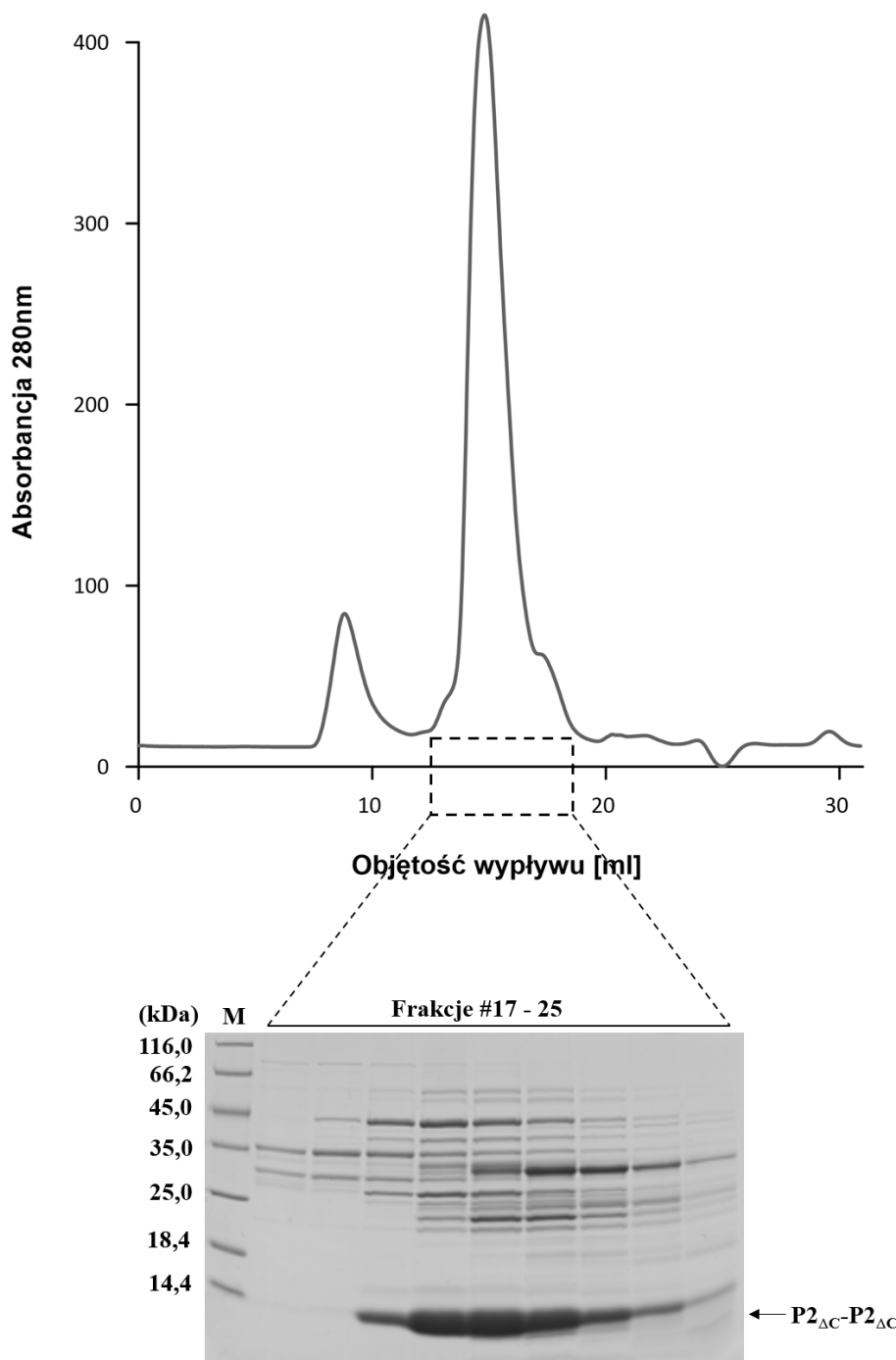
**Ryc. 51. Oczyszczanie kompleksu białek P1 $\Delta$ C-P2 z wykorzystaniem chromatografii sączenia molekularnego. Panel górny:** Chromatogram pokazujący proces rozdziału heterodimeru P1 $\Delta$ C-P2. Przedstawiona krzywa opisuje gęstość optyczną frakcji białkowych podczas chromatografii monitorowaną przy długości fali 280 nm. **Panel dolny:** analiza SDS-PAGE wybranych frakcji białkowych uzyskanych w wyniku rozdziału chromatograficznego kompleksu białek P1 $\Delta$ C-P2 na drodze SEC. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa; frakcje #17-24 - frakcje uzyskane w procesie oczyszczania dimeru, zawierające białka P1 $\Delta$ C-P2. Strzałką wskazano prążki białkowe o masie odpowiadającej białkom P1 $\Delta$ C i P2.



**Ryc. 52. Oczyszczanie kompleksu białek P1<sub>ΔC</sub>-P2 z wykorzystaniem chromatografii sączenia molekularnego. Panel górny:** Chromatogram pokazujący proces rozdziału heterodimeru P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>. Przedstawiona krzywa opisuje gęstość optyczną frakcji białkowych podczas chromatografii monitorowaną przy długości fali 280 nm. **Panel dolny:** analiza SDS-PAGE wybranych frakcji białkowych uzyskanych w wyniku rozdziału chromatograficznego kompleksu białek P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> na drodze SEC. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa; frakcje #17-25 - frakcje uzyskane w procesie oczyszczania dimeru, zawierające białka P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>. Strzałką wskazano prążki białkowe o masie odpowiadającej białkom P1<sub>ΔC</sub> i P2<sub>ΔC</sub>.



**Ryc. 53. Oczyszczanie kompleksu białek P2-P2 z wykorzystaniem chromatografii sączenia molekularnego.** Panel górny: Chromatogram pokazujący proces rozdziału heterodimeru P2-P2. Przedstawiona krzywa opisuje gęstość optyczną frakcji białkowych podczas chromatografii monitorowaną przy długości fali 280 nm. Panel dolny: analiza SDS-PAGE wybranych frakcji białkowych uzyskanych w wyniku rozdziału chromatograficznego kompleksu białek P2-P2 na drodze SEC. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa; frakcje #14-23 - frakcje uzyskane w procesie oczyszczania dimeru, zawierające białka P2-P2. Strzałką wskazano prążki białkowe o masie odpowiadającej homodimerowi białek P2.

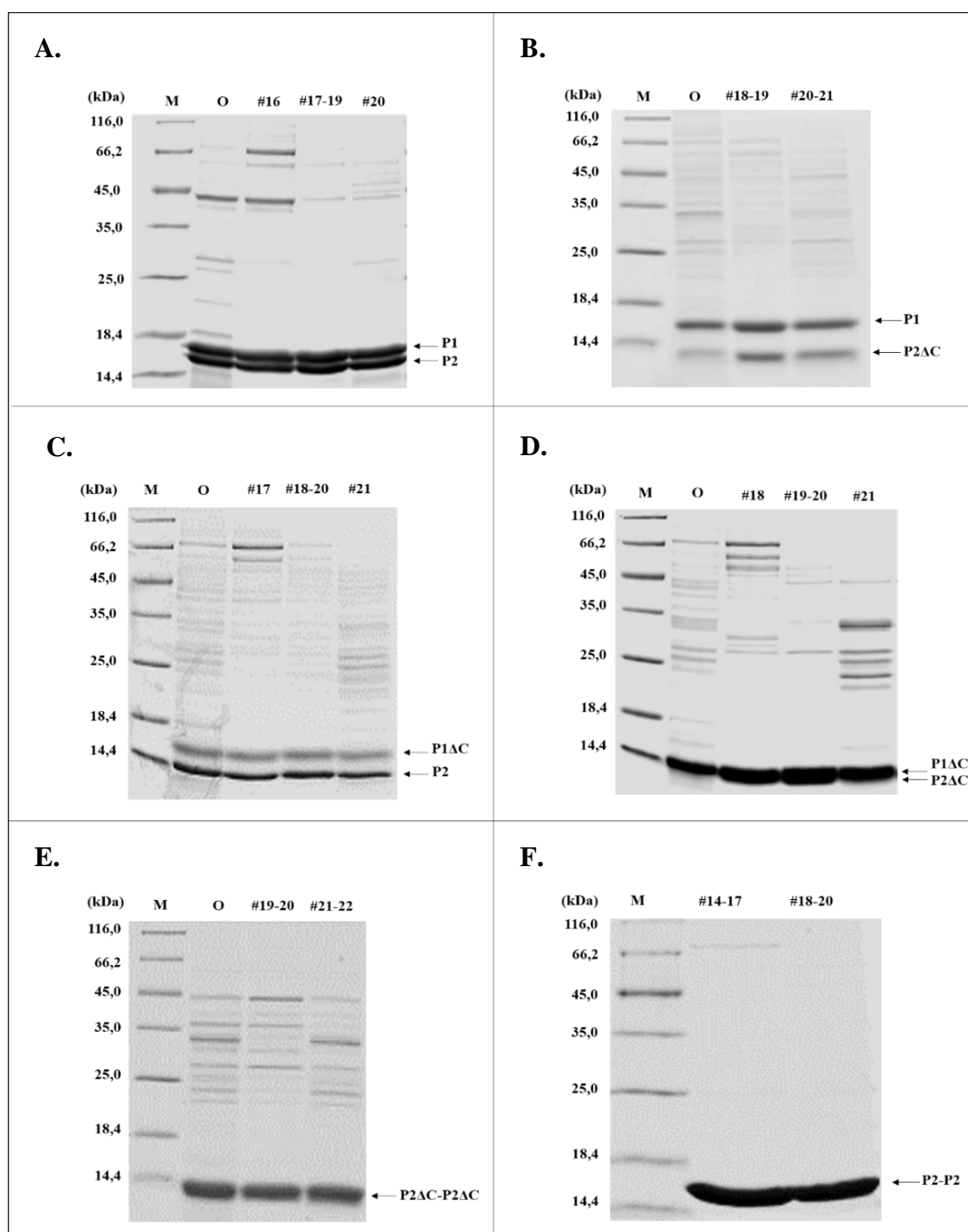


**Ryc. 54. Oczyszczanie kompleksu białek P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> z wykorzystaniem chromatografii sączenia molekularnego. Panel górny:** Chromatogram pokazujący proces rozdziału heterodimeru P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>. Przedstawiona krzywa opisuje gęstość optyczną frakcji białkowych podczas chromatografii monitorowaną przy długości fali 280 nm. **Panel dolny:** analiza SDS-PAGE wybranych frakcji białkowych uzyskanych w wyniku rozdziału chromatograficznego kompleksu białek P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> na drodze SEC. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa; frakcje #17-25 - frakcje uzyskane w procesie oczyszczania dimeru, zawierające białka P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>. Strzałką wskazano prążki białkowe o masie odpowiadającej homodimerowi białek P2<sub>ΔC</sub>.

Oczyszczanie kompleksów białkowych z wykorzystaniem sita molekularnego stanowiło końcowy element w procesie przygotowania dimerów P1-P2 oraz ich form delecyjnych. Frakcja białkowa wypływająca w tzw. pustej objętości kolumny ( $V_0=7,2$  ml) obrazowała strategię wspomnianą powyżej dotyczącą zastosowania na etapie formowania dimerów nadmiaru białka P1, formującego w roztworze wodnym, przy braku naturalnego partnera jakim jest białko P2 oligomerów. Frakcja ta pojawiała się w analizach chromatograficznych wszystkich kompleksów białkowych. Obrazem prawidłowo uformowanych dimerów była frakcja białkowa wypływająca w objętości 14 ml. Symetryczny kształt krzywej chromatograficznej wskazuje na tzw. monodispersyjny charakter próbki, tj. dominującą formą białkową jest heterodimer. Na podstawie analiz SDS-PAGE frakcji białkowych uzyskanych w wyniku rozdziału chromatograficznego poszczególnych kompleksów wybrano frakcje białkowe o największym stopniu homogenności. Następnie, tak oczyszczone dimery poddano weryfikacji przy pomocy analizy SDS-PAGE w celu oceny homogenności próbek (Ryc. 55). W przypadku heterodimeru P1-P2 (Ryc. 55 A) frakcja #16 charakteryzowała się dobrym poziomem oczyszczenia dimeru, jednakże z widocznymi zanieczyszczeniami białkami wysokocząsteczkowymi. Kolejne analizowane frakcje (#17-19 oraz #19) były w dużym stopniu pozbawione zanieczyszczeń widocznych w preparacie nanoszonym na sito molekularne (O) i we frakcji #16. Frakcje białkowe kompleksu P1-P2 $\Delta$ C (Ryc. 55 B), w porównaniu do frakcji nanoszonej na sito molekularne (O), cechowały się bardzo dobrym poziomem oczyszczenia, z widocznymi niewielkimi zanieczyszczeniami białkami o większej masie molekularnej. W przypadku dimeru P1 $\Delta$ C-P2 (Ryc. 55 C) stopień oczyszczenia kompleksu był na zadowalającym poziomie, a najlepiej oczyszczoną frakcją była frakcja #18-20. Porównując do frakcji białkowej heterodimeru P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C (Ryc. 55 D) nanoszonej na sito molekularne (O), z oczyszczanych frakcji udało się usunąć większość białek wysokocząsteczkowych stanowiących zanieczyszczenie próbki. W tym przypadku najwyższym stopniem oczyszczenia cechowała się frakcja #19-20. Dimer delecyjny P2 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C (Ryc. 55 E) charakteryzował się najniższym poziomem oczyszczenia. Porównując oczyszczone frakcje białkowe do preparatu nanoszonego na kolumnę chromatograficzną (O) w zadowalającym stopniu usunięto wysokocząsteczkowe białka zanieczyszczające próbkę. Kompleksem o najwyższym stopniu homogenności był homodimer P2-P2 (Ryc. 55 F). Dimer P2-P2 to również kompleks, który oczyszczono z najwyższą wydajnością. Wszystkie analizowane białka w formie dimerów lokalizowały się w żelu poliakrylamidowym na poziomie odpowiadającym masom molekularnym

indywidualnych białek wchodzących w skład poszczególnych kompleksów. Wydajność oczyszczania występowała na poziomie 1-2 mg oczyszczonego białka. Tak przygotowane preparaty, przeznaczone do analiz w celu oceny parametrów biofizycznych poszczególnych kompleksów białkowych.





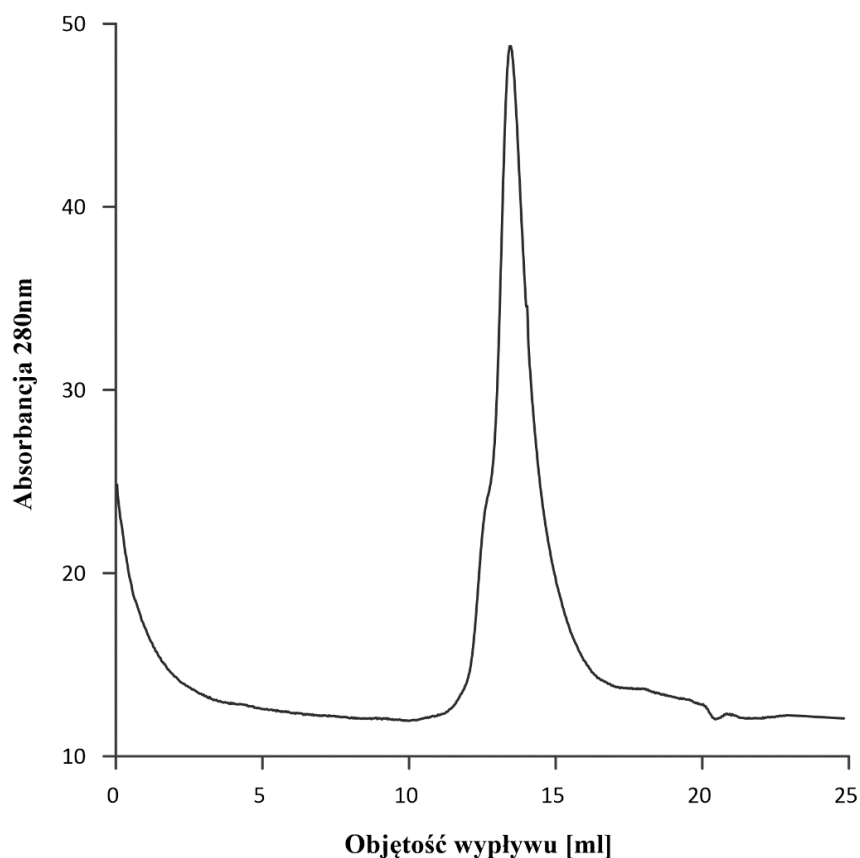
**Ryc. 55. Analiza SDS-PAGE poszczególnych frakcji białkowych zawierających dimery białek P1-P2 uzyskanych na drodze oczyszczania z wykorzystaniem sita molekularnego. A.** frakcje o różnej skali czystości zawierające heterodimer P1-P2 (#16, #17-19, #20) **B.** frakcje zawierające heterodimer P1-P2 $\Delta$ C (#18, #19-20, #21) **C.** frakcje zawierające heterodimer P1 $\Delta$ C -P2 (#17, #18-20, #21) **D.** frakcje zawierające heterodimer P1 $\Delta$ C -P2 $\Delta$ C (#18-#19, #20-21) **E.** frakcje zawierające homodimer P2 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C (#19-20, #21-22) **F.** frakcje zawierające homodimer P2-P2 (#14-17, #18-20). O – preparat zawierający dimery białkowe, nanoszony na kolumnę chromatograficzną; M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa. Strzałkami wskazano prążki białkowe o masach odpowiadających poszczególnym białkom P.

## **4. Charakterystyka biochemiczna i biofizyczna kompleksów rekombinowanych białek P1/P2**

Kompleksy uzyskane w procesie oczyszczania metodami chromatograficznymi zostały wykorzystane do oceny parametrów biofizycznych uformowanych dimerów. Na podstawie analizy wykonanych na bazie SDS-PAGE wybrano frakcje charakteryzujące się najwyższym poziomem homogenności. I tak, do analiz biofizycznych wykorzystano: w przypadku kompleksu P1-P2 frakcje #17-19 (Ryc. 55 A), dla kompleksu P1- P2<sub>ΔC</sub> frakcje #18-19 (Ryc. 55 B), dla kompleksu P1<sub>ΔC</sub>-P2 frakcje #18-20 (Ryc. 55 C), dla kompleksu P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> frakcja #19-20 (Ryc. 55 D), w przypadku homodimeru P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> również frakcja #19-20, zaś dla kompleksu P2-P2 frakcja #14-17. Wszystkie wykonane analizy biofizyczne, którym poddano poszczególne dimery białek P1-P2 miały na celu weryfikację poprawności strukturalnej uformowanych kompleksów, ocenę ich stabilności, potwierdzenie natywnego charakteru, a w związku z tym funkcjonalności poszczególnych kompleksów.

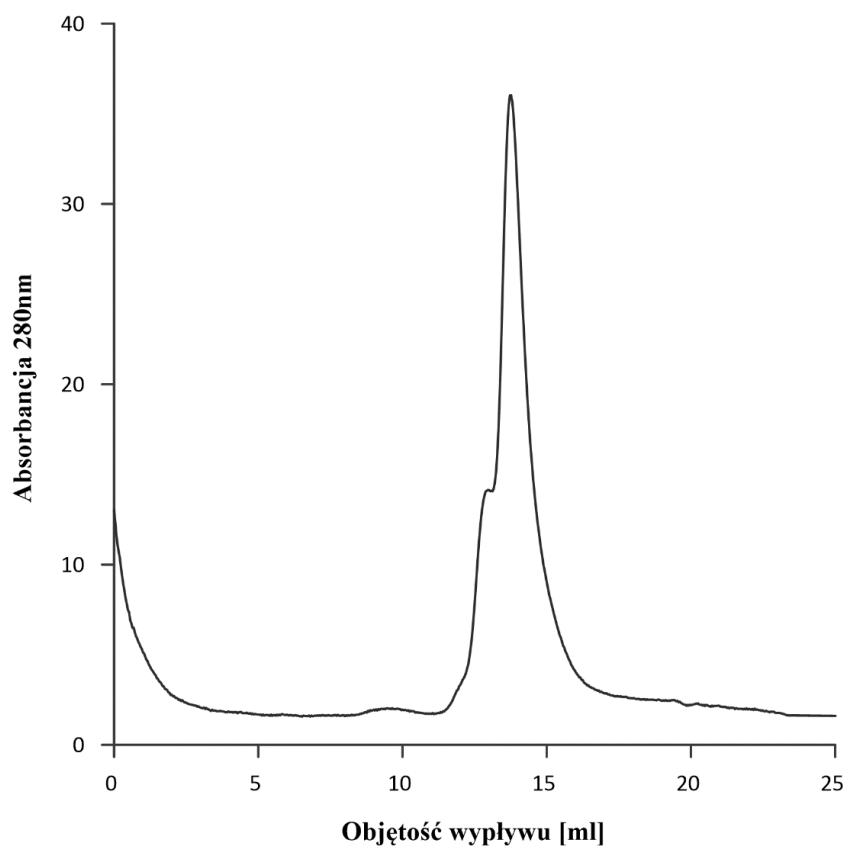
### **4.1 Analiza z wykorzystaniem analitycznego sita molekularnego - SEC**

Pierwszym etapem w charakterystyce dimerów białkowych była analiza SEC, która pozwoliła na sprawdzenie poziomu homogenności dimerów pod kątem oligomeryzacji. W tym celu wykorzystano analityczną chromatografię sita molekularnego, która pozwala na wysoką precyzję rozdziału frakcji białkowych pod względem ich masy molekularnej. Do analizy wykorzystano następujące kompleksy: P1-P2, P1-P2<sub>ΔC</sub>, P1<sub>ΔC</sub>-P2, P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>, P2-P2, P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> (Ryc. 56-61).



**Ryc. 56. Chromatografia SEC dimeru P1-P2.** Na kolumnę Superose 12 HR 10/30 naniesiono 100  $\mu$ l dimeru P1-P2, o stężeniu 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Chromatografię prowadzono z wykorzystaniem systemu FPLC Äkta Purifier

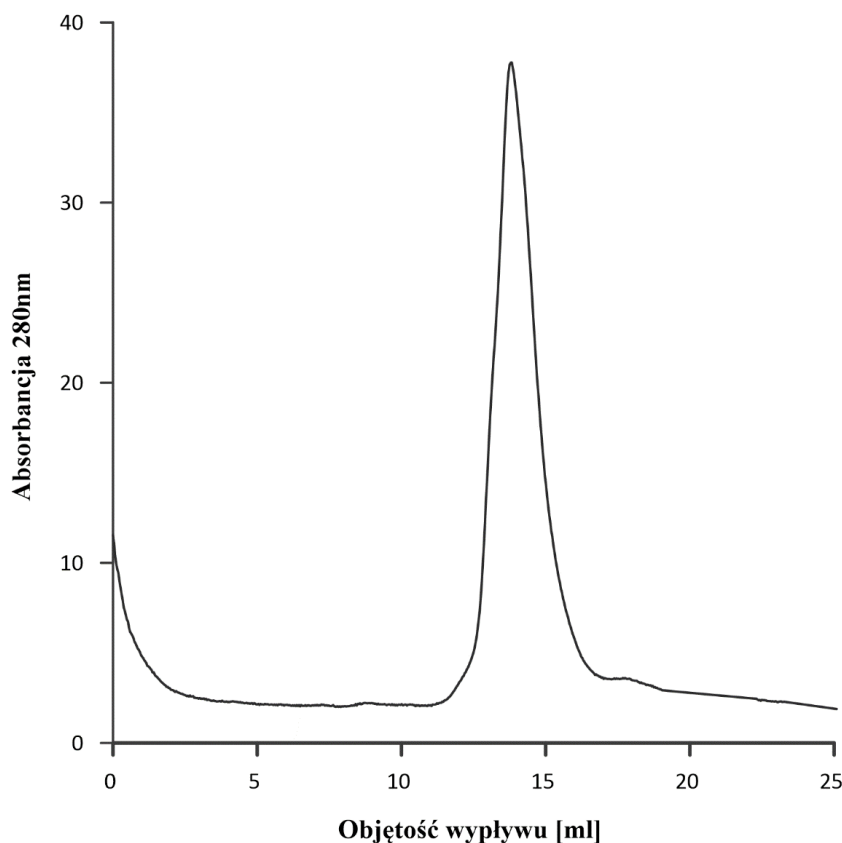
Analiza SEC wykazała, że kompleks P1-P2 wypływa z kolumny w formie symetrycznego, pojedynczego piku chromatograficznego, co razem z kształtem krzywej wskazuje na monodispersyjny charakter badanej próbki, tj. dimer P1-P2 występuje tylko w jednej formie strukturalnej. Na uwagę zasługuje fakt, iż obliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej masa molekularna kompleksu P1-P2 to 24 kDa. Dimer wypływał w objętości 13,44 ml, co wskazywało na masę molekularną kompleksu o wartości 70 kDa (masa została obliczona na podstawie krzywej kalibracyjnej mas molekularnych dla wykorzystanej kolumny Superose 12 HR 10/30). Zjawisko to zostało już wcześniej opisane [106] i wynika to z faktu, że kompleks białek P1-P2 nie posiada tzw. kształtu globularnego, a jego struktura jest wydłużona, co zaburza migrację na sicie molekularnym.



**Ryc. 57. Chromatografia SEC dimeru P1-P2<sub>ΔC</sub>.** Na kolumnę Superose 12 HR 10/30 naniesiono 100 μl dimeru P1-P2<sub>ΔC</sub>, o stężeniu 1 μg/μl. Chromatografię prowadzono z wykorzystaniem systemu FPLC Äkta Purifier

W dalszej kolejności przeprowadzono analizę SEC kompleksu P1-P2<sub>ΔC</sub>. Podobnie jak w przypadku dimeru P1-P2 otrzymano krzywą chromatograficzną o symetrycznym, jednakże nieco zaburzonym kształcie, co mogło wskazywać na obecność niewielkiej puli niepoprawnie sfałdowanych białek. Jednakże pełny obraz krzywej sugeruje, że w znaczącej przewadze występowały poprawnie uformowane kompleksy P1-P2<sub>ΔC</sub>. Analogicznie do analizy SEC kompleksu P1-P2 masa molekularna dimeru P1-P2<sub>ΔC</sub> obliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej to 22 kDa, ale i w tym przypadku dimer wypływał w objętości 13,73 ml, która w oparciu o krzywą kalibracyjną mas molekularnych dla wykorzystanej kolumny wskazywała na masę molekularną kompleksu 61 kDa. Tak jak poprzednio, wyższa masa molekularna analizowanego kompleksu wynika z wydłużonej struktury kompleksu zaburzającej migrację białka na sicie molekularnym. Masa ta jest niższa niż w przypadku heterodimeru P1-P2 z uwagi na fakt, iż białko P2 występuje w formie delecyjnej, tj. pozbawionej jednego C-końca, co zmienia strukturę kompleksu i tym samym wpływa na

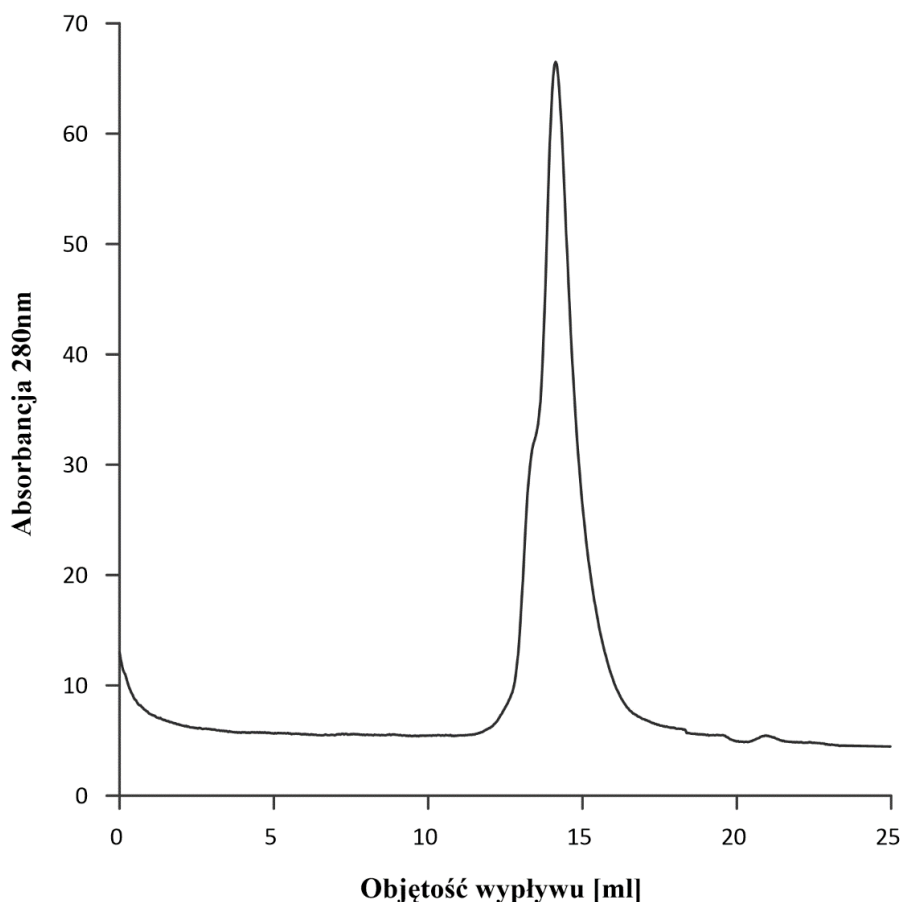
zmianę kształtu cząsteczki, czego z kolei odbiciem jest zmieniona migracja białka na sicie molekularnym.



**Ryc. 58. Chromatografia SEC dimeru P1<sub>ΔC</sub>-P2.** Na kolumnę Superose 12 10/30HR naniesiono 100 μl dimeru P1<sub>ΔC</sub>-P2, o stężeniu 1 μg/μl. Chromatografię prowadzono z wykorzystaniem systemu FPLC Äkta Purifier.

Kolejną analizą wykonaną z wykorzystaniem sita molekularnego była analiza kompleksu P1<sub>ΔC</sub>-P2. Badany kompleks wypływając z sita molekularnego także daje symetryczny kształt krzywej chromatograficznej co świadczy o monodispersyjnym charakterze analizowanej próbki. Obliczona masa molekularna dimeru P1<sub>ΔC</sub>-P2 to 22,5 kDa, ale podobnie jak w przypadku poprzednich kompleksów, ze względu na wydłużoną strukturę przestrzenną kompleksu wpływał on w objętości 13,8 ml, co w oparciu o krzywą kalibracyjną mas molekularnych dla wykorzystanej kolumny (Superose 12 HR 10/30), świadczyło o masie molekularnej 58 kDa. Analogicznie do poprzednio analizowanych kompleksów i w tym przypadku wyższa masa molekularna kompleksu P1<sub>ΔC</sub>-P2 wynika z wydłużonej struktury kompleksu zaburzając tym samym migrację cząsteczki na sicie molekularnym. Natomiast,

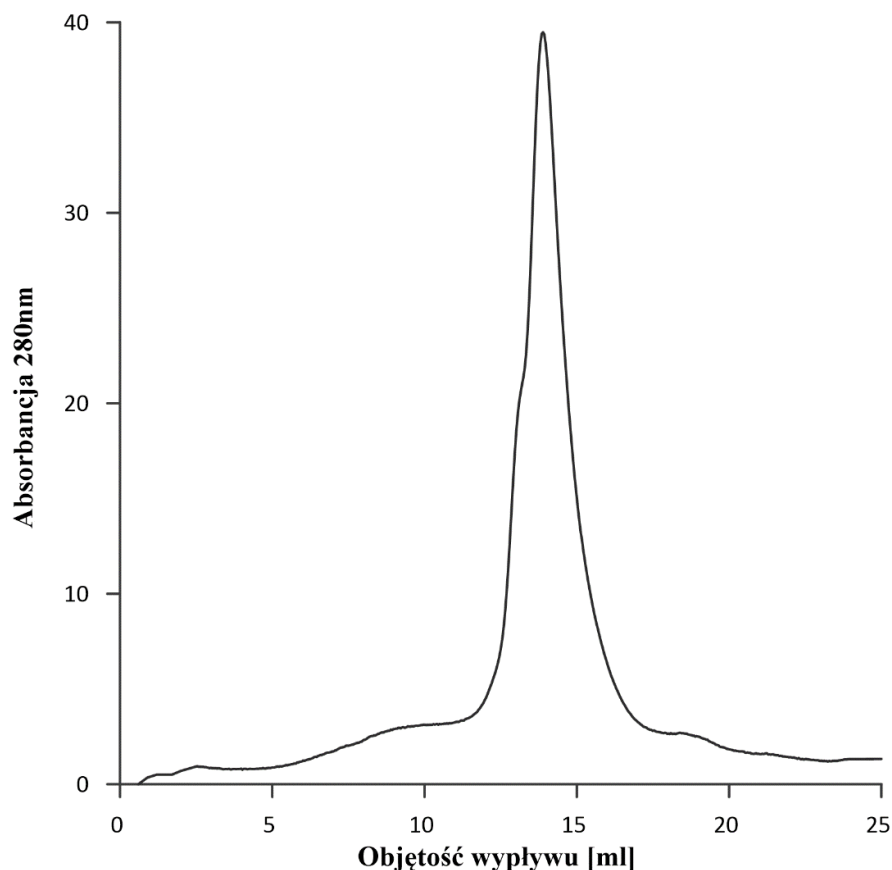
podobnie do kompleksu P1-P2 $\Delta$ C, masa ta jest niższa z uwagi na fakt, iż białko P1 występuje w formie delecyjnej, tj. pozbawionej sekwencji C-końca.



**Ryc. 59.** Chromatografia SEC dimeru P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C. Na kolumnę Superose 12 10/30HR naniesiono 100  $\mu$ l dimeru P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C, o stężeniu 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Chromatografię prowadzono z wykorzystaniem systemu FPLC Äkta Purifier.

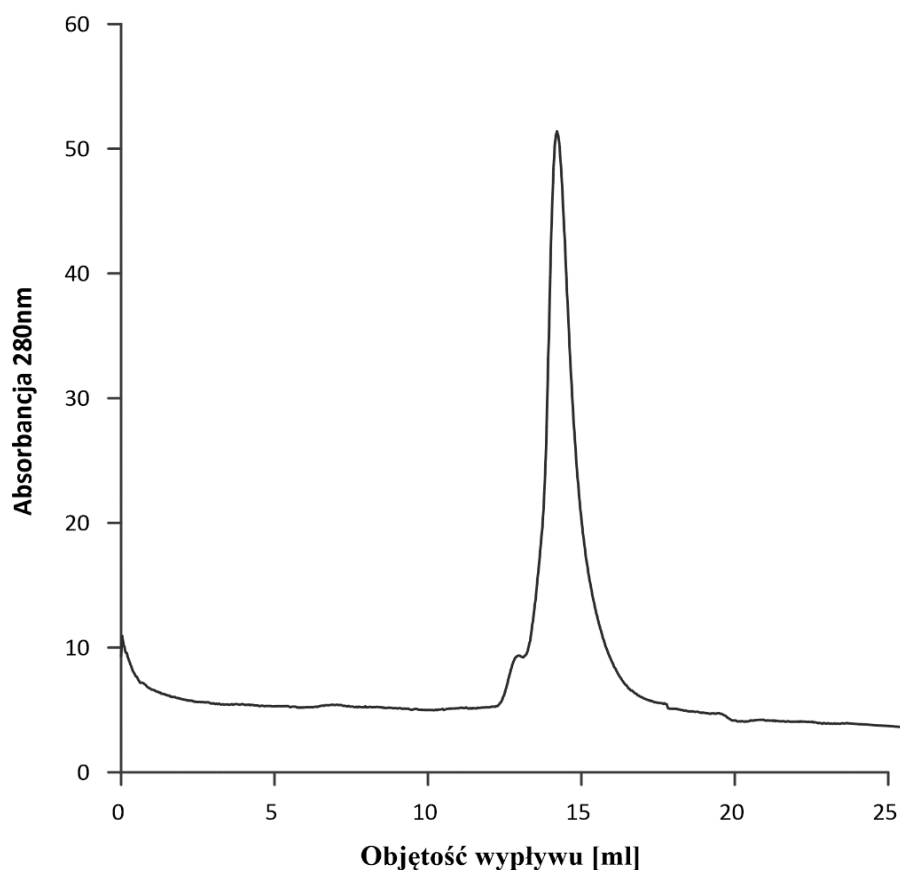
Ostatnim z analizowanych heterodimerów był kompleks P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C. Krzywa chromatograficzna, tak jak w przypadku poprzednich kompleksów również wykazywała symetryczny kształt potwierdzając monodispersyjność badanej próbki. Obliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej masa molekularna dimeru P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C wynosi 20,6 kDa. Z kolei frakcja białkowa zawierająca kompleks P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C wypływała w objętości 14,14 ml co zgodnie z krzywą kalibracyjną mas molekularnych dla wykorzystanej kolumny odpowiadało masie 46 kDa. Ponownie, jak w przypadku pozostałych analizowanych dimerów masa jest niższa niż w przypadku heterodimeru P1-P2 z uwagi na fakt, iż oba białka formujące kompleks, P1 i P2 występują w formie delecyjnej, tj. pozbawionej dwóch

C-końców. Brak mobilnych, nieustrukturalizowanych domen C-terminalnych ograniczył kształt cząsteczki zbliżając go do układu globularnego.



**Ryc. 60.** Chromatografia SEC dimeru P2-P2. Na kolumnę Superose 12 10/30HR naniesiono 100  $\mu$ l dimeru P2-P2, o stężeniu 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Chromatografię prowadzono z wykorzystaniem systemu FPLC Äkta Purifier.

Próbka zawierająca homodimer P2-P2 także została poddana analizie SEC, dając podobne wyniki jak heterodimery. Krzywa chromatograficzna wykazała symetryczny kształt świadczący o monodispersyjnej postaci kompleksu w roztworze wodnym. Obliczona masa molekularna kompleksu P2-P2 wynosi 24,5 kDa, z kolei dimer wypływał w objętości 13,48 ml, co w porównaniu do krzywej kalibracyjnej mas molekularnych dla wykorzystanej kolumny, świadczyło o masie molekularnej kompleksu 72 kDa. Homodimer P2-P2, podobnie jak heterodimeru P1-P2 nie posiada kształtu globularnego, a nieustrukturalizowane C-końce obu białek P2 nadają cząsteczce wydłużony kształt zmieniając migrację dimeru w sicie molekularnym.

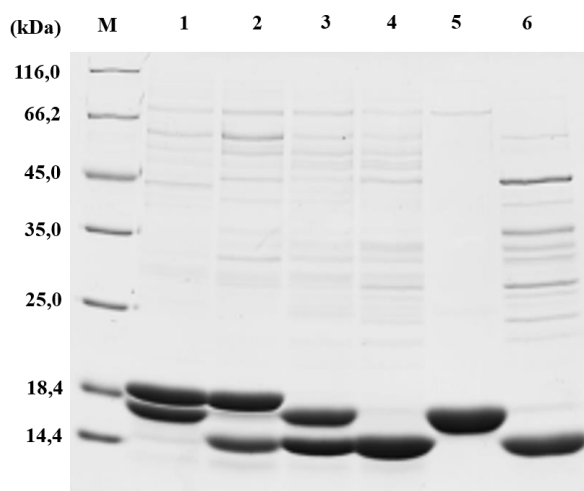


**Ryc. 61.** Chromatografia SEC dimeru  $P2_{\Delta C}-P2_{\Delta C}$ . Na kolumnę Superose 12 10/30HR naniesiono 100  $\mu$ l dimeru  $P2_{\Delta C}-P2_{\Delta C}$ , o stężeniu 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Chromatografię prowadzono z wykorzystaniem systemu FPLC Äkta Purifier.

Końcowym z przeanalizowanych kompleksów był homodimer  $P2_{\Delta C}-P2_{\Delta C}$ . Jak w przypadku pozostałych kompleksów, otrzymana krzywa chromatograficzna również wykazała symetryczny kształt, tym samym wskazując na monodispersyjny charakter próbki. Obliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej masa to 20,7 kDa, natomiast frakcja białkowa zawierająca kompleks  $P2_{\Delta C}-P2_{\Delta C}$  wypływała przy objętości 14,21 ml, co biorąc pod uwagę krzywą kalibracyjną mas molekularnych dla kolumny Superose 12 HR 10/30, odpowiadało masie molekularnej 44 kDa. Analogicznie jak w przypadku pozostałych kompleksów różnica pomiędzy masą teoretyczną a faktycznym momentem wypływu frakcji białkowej z kolumny związana była z kształtem cząsteczki. Mniejsza dysproporcja między masami związana była z brakiem obu C-końców białek P2 w homodimerze  $P2_{\Delta C}-P2_{\Delta C}$ , co spowodowało ograniczenie kształtu cząsteczki zbliżając go do układu globularnego, charakteryzującego się ułatwioną migracją na sicie molekularnym.



Wszystkie frakcje kompleksów białkowych otrzymane na drodze chromatografii SEC zebrano i zweryfikowano przy pomocy elektroforezy SDS-PAGE (Ryc. 62). Wszystkie rekombinowane białka wchodzące w skład dimerów lokalizowały się na poziomie odpowiadającym masom molekularnym indywidualnych białek wchodzących w skład poszczególnych kompleksów. Stopień oczyszczenia poszczególnych heterodimerów był na porównywalnym poziomie. W przypadku homodimerów, kompleks P2-P2 charakteryzował się bardzo dobrym poziomem oczyszczenia, natomiast kompleks delecyjny P2 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C cechował się wyższym poziomem zanieczyszczeń białkami o wyższej masie molekularnej.

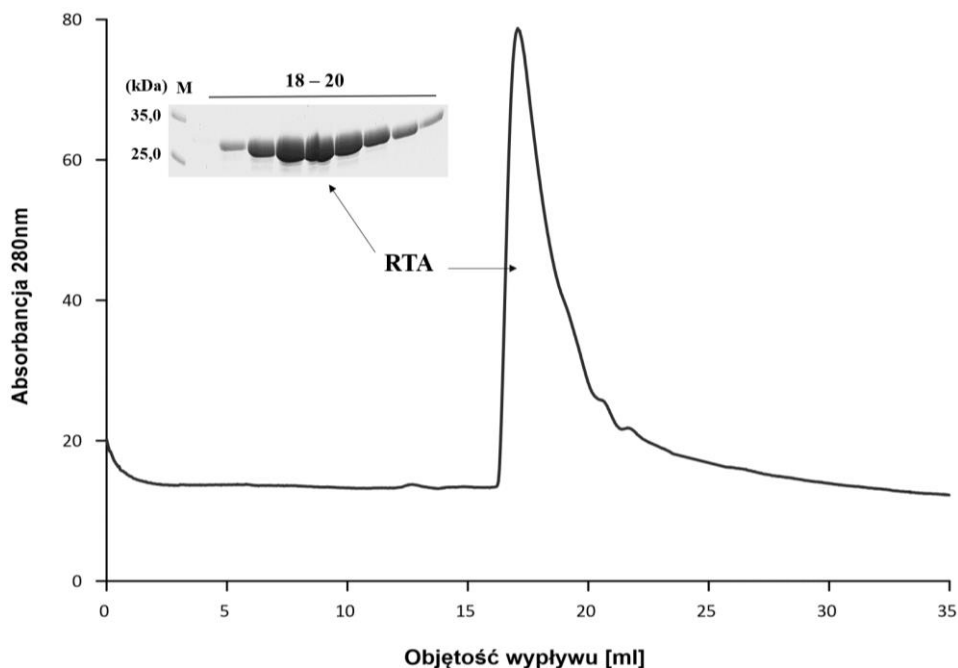


**Ryc. 62. Analiza SDS-PAGE kompleksów białkowych.** 1 – heterodimer P1-P2, 2 – heterodimer P1-P2 $\Delta$ C, 3 – heterodimer P1 $\Delta$ C-P2, 4 – heterodimer P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C, 5 – homodimer P2-P2, 6 – homodimer P2 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C. Próbkę dimerów nanoszonych na żel miały jednakową zawartość białka - 10  $\mu$ g. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa.

Podsumowując, analiza SEC poszczególnych kompleksów wykazała, że wszystkie analizowane kompleksy posiadały charakter monodispersyjny, czego wyrazem był obraz chromatograficzny pokazujący krzywe chromatograficzne o symetrycznym kształcie; w związku z tym można było stwierdzić, że kompleksy w środowisku wodnym posiadają strukturę dimeru, a tym samym mają zachowane parametry biofizyczne wskazujące, że kompleksy te odzwierciedlają formę natywną tj. mają charakter dimeru.

Kolejnym białkiem jakie zostało podane analizie SEC było rekombinowane białko RTA. RTA jest jedną z dwóch podjednostek wchodzących w skład rycyny, molekule należące do rodziny białek RIP, będącego jedną z najbardziej toksycznych substancji syntetyzowanych w królestwie roślin. Jak opisano powyżej, w analizie wykorzystano tylko rekombinowane RTA, które wiąże się bezpośrednio z białkami P. Po oczyszczeniu RTA

z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, białko rekombinowane zostało poddane analizie SEC (Ryc. 63).



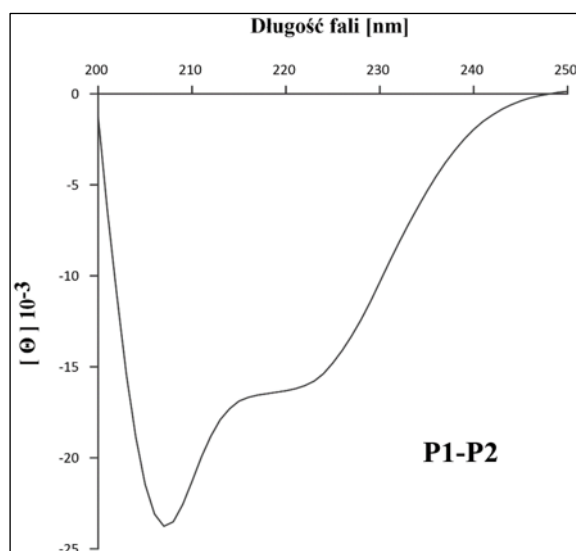
**Ryc. 63. Charakterystyka katalitycznej podjednostki A rycyny (RTA) metodą sita molekularnego.** Chromatogram preparatu białka RTA oraz analiza SDS-PAGE frakcji RTA uzyskanych na drodze SEC. M - markery białkowe, masa molekularna wyrażona w kDa, frakcje #18-20 – frakcje białkowe otrzymane w wyniku analizy chromatograficznej SEC. Strzałkami wskazano prążki białkowe o masie około 32 kDa, odpowiadającej masie białka RTA oraz wykres chromatograficzny pokazujący profil wypływu RTA z kolumny Superose 12 10/30HR.

W oparciu o analizę SEC uzyskano obraz chromatograficzny białka RTA wskazujący na monodispersyjny charakter badanej próbki, który świadczył, że RTA występuje w formie monomerycznej. Frakcja białkowa wypływająca w objętości 17 ml odpowiadała masie molekularnej 32 kDa, co wskazało, że RTA posiada strukturę globularną białka i występuje jako monomer w roztworze. Frakcje białkowe zebrane w czasie rozdzielania chromatograficznego poddano analizie SDS-PAGE, w celu identyfikacji frakcji zawierającej RTA (Ryc. 63). Obraz rozdzielania frakcji białkowych otrzymany w wyniku analizy SDS-PAGE wskazywał na wysoki stopień oczyszczenia białka RTA .

## 4.1 Dichroizm kołowy (ang. *circular dichroism* - CD)

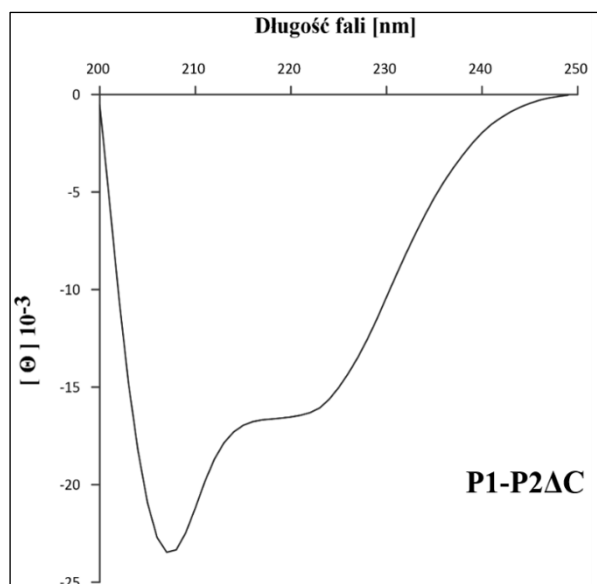
Cząsteczki chiralne jakimi są aminokwasy, z których zbudowane są białka, mogą w różnych sposób oddziaływać ze światłem spolaryzowanym, a co za tym idzie białka można potraktować jako tzw. ośrodki aktywne optycznie, które oddziaływując ze światłem spolaryzowanym zmieniając parametry absorpcji światła spolaryzowanego w zakresie UV/VIS; zjawisko to stało się podstawą spektroskopii dichroizmu kołowego (ang. *Circular Dichroism*, CD). W rezultacie otrzymuje się widma CD, które stanowią zależność sygnału CD w stosunku do fali światła, co ma przełożenie na określenie zawartości struktury drugorzędowej białka. Białko będąc ośrodkiem aktywnym optycznie daje sygnał CD w paśmie absorpcji wiązania peptydowego (160-240 nm), a co ważne siła sygnału i przebieg widma CD jest zależne od struktury drugorzędowej w obrębie badanego białka. Każda struktura drugorzędowa białka posiada odmienne parametry, a tym samym przebieg widm CD dla poszczególnych rodzajów struktur jest odmienny, co umożliwia wyznaczenie udziału poszczególnych rodzajów struktur w badanym białku. Niestety, analiza CD ma charakter porównawczy - mając widmo wzorcowe, można analizować układy pokrewne. Również grupy prostetyczne lub ligandy chromoforowe związane z białkiem mogą wykazywać dichroizm kołowy. Wszystkie te efekty są wrażliwe na strukturę drugo- i trzeciorzędową białka, co sprawia, że spektroskopia CD jest przydatną techniką do analizy konformacji białka oraz śledzenia zmian występujących w jej obrębie [194]. W konsekwencji, wykorzystując technikę CD, przeanalizowano wszystkie otrzymane dimery. Jako pierwszy poddano analizie CD heterodimer białek P1-P2 (Ryc. 64), następnie dimer P1-P2<sub>ΔC</sub> (Ryc. 65), dimer P1<sub>ΔC</sub>-P2 (Ryc. 66) i jako ostatni z heterodimerów P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> (Ryc. 67). Analogicznie do heterodimerów białek P1-P2 analizie CD poddano także dwa homodimery: P2-P2 (Ryc. 68 A) oraz P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> (Ryc. 68 B).

W pierwszej kolejności analizie CD poddano heterodimer P1-P2 (Ryc. 64), w celu określenia podstawowych parametrów strukturalnych układu, który nie jest zmieniony na drodze delekcji C-terminalnych fragmentów oraz co ważne, był już analizowany metoda CD oraz posiada opracowaną strukturę przestrzenną metodą NMR [187,195]. W wyniku analizy CD heterodimeru P1-P2 uzyskano widmo CD z wyraźnymi minimami przy 208 nm i 222 nm. Parametry te są charakterystyczne dla  $\alpha$ -helikalnych struktur w badanym białku, potwierdzając wcześniejsze analizy [187] oraz wskazując że dimer posiada poprawną strukturę. Przy zastosowaniu identycznych warunków analizy wykonano pomiary CD kolejnych kompleksów białkowych.



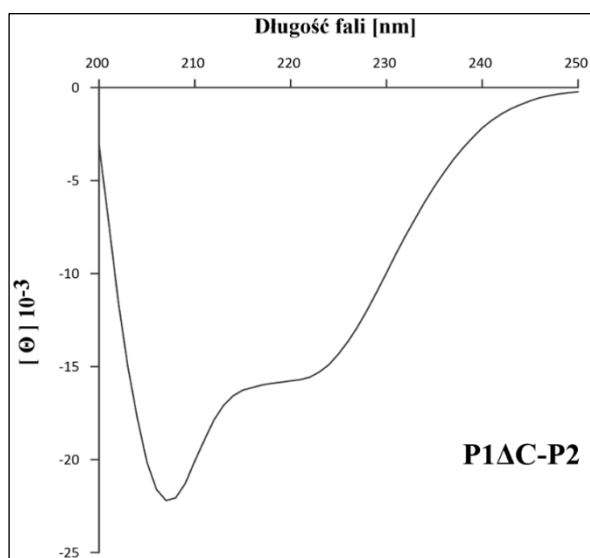
**Ryc. 64. Widmo CD heterodimeru białek P1-P2.** Pomiary CD prowadzone były w temperaturze 25 °C, w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 0,2 cm, przy szerokości szczeliny 1 nm, z szybkością rejestrowania danych 60 nm/min. Każde z widm rejestrowano w trzech powtórzeniach, a następnie uzyskane wartości uśredniano. Uzyskiwany sygnał przeliczono na eliptyczność molową  $[\Theta]$  ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ).

Analiza CD heterodimeru P1-P2 $\Delta$ C (Ryc. 65) wskazała, że widmo CD posiada dwa minima przy 208 nm i 222 nm, charakterystyczne dla  $\alpha$ -helikalnych struktur białek.



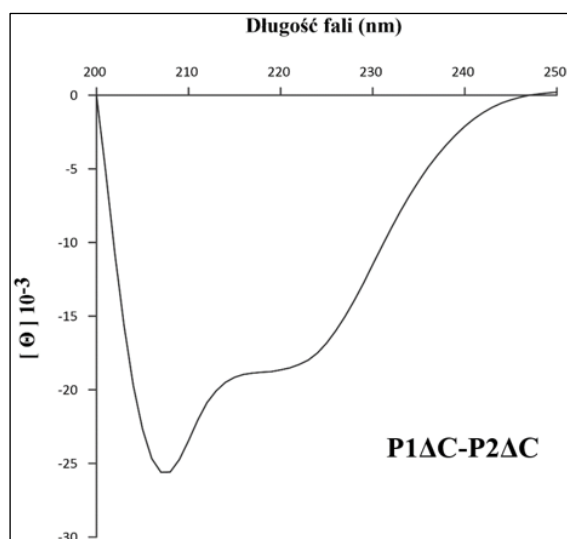
**Ryc. 65. Widmo CD heterodimeru białek P1-P2 $\Delta$ C** Pomiary CD prowadzone były w temperaturze 25 °C, w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 0,2 cm, przy szerokości szczeliny 1 nm, z szybkością rejestrowania danych 60 nm/min. Każde z widm rejestrowano w trzech powtórzeniach, a następnie uzyskane wartości uśredniano. Uzyskiwany sygnał przeliczono na eliptyczność molową  $[\Theta]$  ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ).

Analogicznie wykonano pomiary CD dla drugiego kompleksu delecyjnego P1 $\Delta$ C-P2 (Ryc. 66), z pozbawionym domeny CTD białkiem P1. Otrzymane w rezultacie widmo CD było bliźniacze do widma heterodimeru P1-P2 $\Delta$ C. W obrębie uzyskanego widma CD także można było wyróżnić dwa charakterystyczne minima przy 208 nm i 222 nm, a co ważne odzwierciedlały one przebieg widma dla kompleksu P1-P2, wskazując że analizowany kompleks posiada dobrze ustrukturalizowane jądro zbudowane z  $\alpha$ -helikalnych struktur.



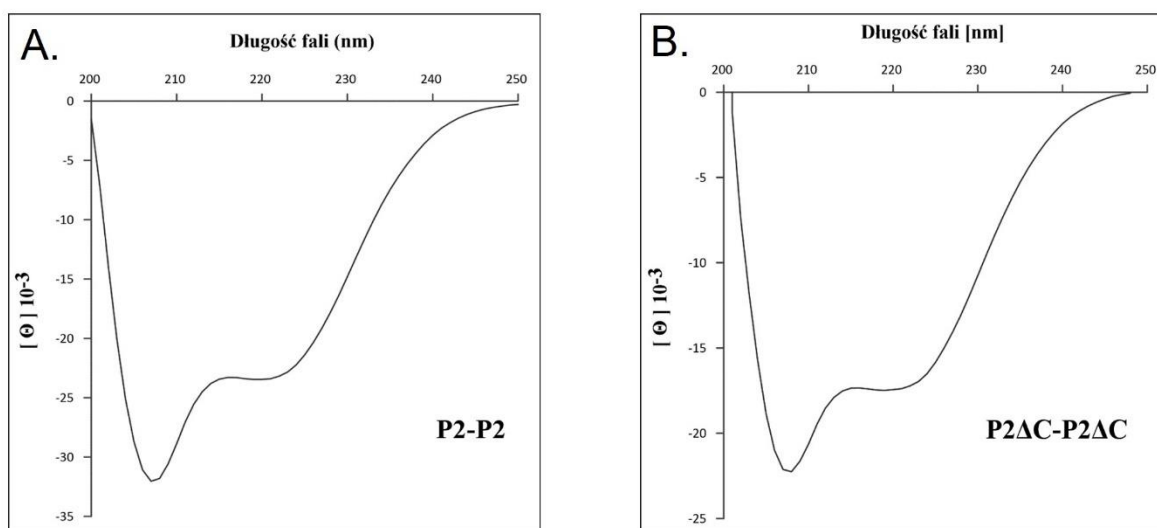
**Ryc. 66. Widmo CD heterodimeru białek P1 $\Delta$ C-P2.** Pomiary CD prowadzone były w temperaturze 25 °C, w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 0,2 cm, przy szerokości szczeliny 1 nm, z szybkością rejestrowania danych 60 nm/min. Każde z widm rejestrowano w trzech powtórzeniach, a następnie uzyskane wartości uśredniano. Uzyskiwany sygnał przeliczano na eliptyczność molową  $[\Theta]$  (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>).

Ponadto wykonano analizy dla heterodimeru P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C (Ryc. 67), których widmo CD także wskazało, że kompleks ten posiada dobrze ustrukturalizowany element zbudowany z elementów  $\alpha$ -helikalnych.



**Ryc. 67. Widmo CD heterodimeru białek P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>.** Pomiary CD prowadzone były w temperaturze 25 °C, w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 0,2 cm, przy szerokości szczeliny 1 nm, z szybkością rejestrowania danych 60 nm/min. Każde z widm rejestrowano w trzech powtórzeniach, a następnie uzyskane wartości uśredniano. Uzyskiwany sygnał przeliczano na eliptyczność molową [Θ] (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>).

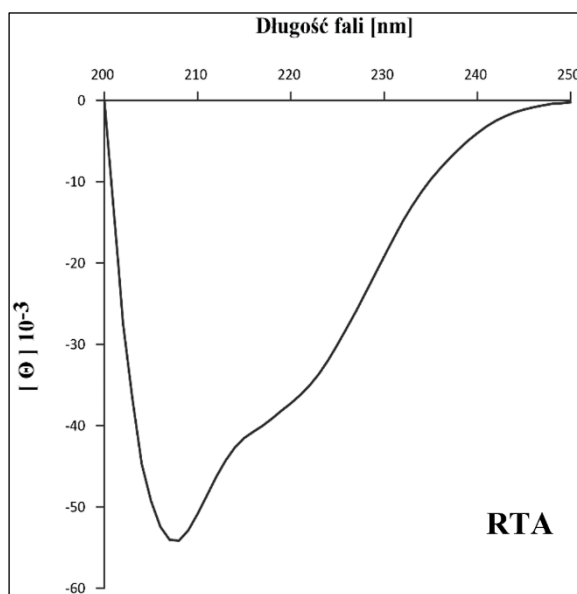
Analogicznie przeprowadzono analizy dla obu homodimerów białek P2: kompleksu pełnych białek P2-P2 (Ryc. 68 A) oraz jego formy delecyjnej P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> (Ryc. 68 B), a otrzymane widma CD jednoznacznie wskazały, że białka te, mimo tego że występują w formie homodimerycznej, która nie jest rozpatrywana jako układ natywny, także posiadają dobrze wykształcone jądro strukturalne zbudowane z α-helikalnych elementów.



**Ryc. 68. Widmo CD homodimerów P2-P2 (A) oraz P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> (B).** Pomiary CD prowadzone były w temperaturze 25 °C, w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 0,2 cm, przy szerokości szczeliny 1 nm, z szybkością rejestrowania danych 60 nm/min. Każde z widm rejestrowano w trzech powtórzeniach, a następnie uzyskane wartości uśredniano. Uzyskiwany sygnał przeliczano na eliptyczność molową [Θ] (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>).

Podsumowując, pomiary widm CD wszystkich badanych kompleksów wykazały, że uzyskane krzywe dla poszczególnych dimerów wskazują, że wszystkie kompleksy, odzwierciedlają strukturalnie heterodimer P1-P2, który posiada  $\alpha$ -helikalną strukturę, stanowiącą zasadniczy element strukturalny. Oszacowany udział  $\alpha$ -helis był na poziomie 49%, co było zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi na ten temat [187]. A zatem, widma CD potwierdziły, że kompleksy delecyjne zachowały właściwości strukturalne podobne do tych, które występują w nienaruszonym kompleksie składającym się z pełnym białek P.

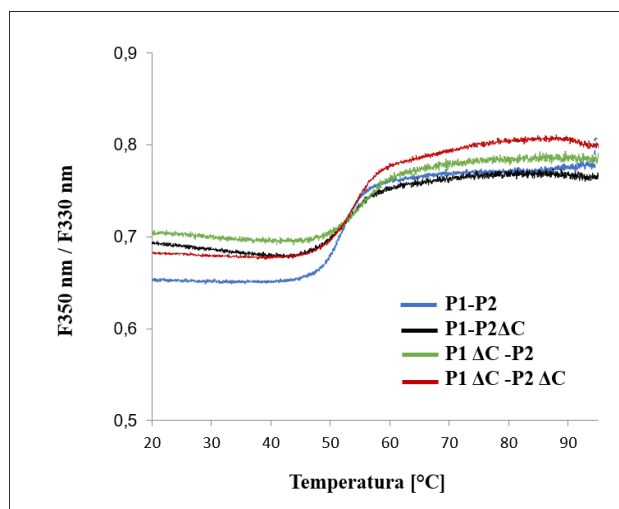
Dodatkowo, w zakresie analiz CD przebadano rekombinowane białko RTA (Ryc. 69). W przeciwieństwie do dimerów białek P widmo CD uzyskane dla cząsteczki RTA nie posiadało dobrze wykształconego minimum przy długości fali 222 nm, co jest charakterystyczne dla białek, które zawierają różne struktury, tj.  $\alpha$  i  $\beta$ . Wynik ten znajduje potwierdzenie w danych strukturalnych, które pokazują, że RTA należy do klasy białek  $\alpha/\beta$  [196,197].



**Ryc. 69. Widmo CD cząsteczki RTA.** Pomiary CD prowadzone były w temperaturze 25 °C, w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 0,2 cm, przy szerokości szczeliny 1 nm, z szybkością rejestrowania danych 60 nm/min. Każde z widm rejestrowano w trzech powtórzeniach, a następnie uzyskane wartości uśredniano. Uzyskiwany sygnał przeliczano na eliptyczność molową [ $\Theta$ ] ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ).

## 4.2 Ocena stabilności termicznej kompleksów białek P1/P2

W ramach analiz biofizycznych, ukierunkowanych na weryfikację parametrów strukturalnych otrzymanych kompleksów białkowych, poszczególne dimery poddano analizie oceny stabilności termicznej w procesie termicznej denaturacji, wykorzystując technikę nanoDSF. W technice tej białko będące w roztworze poddawane jest działaniu gradientu temperatury, który prowadzi do rozfałdowania białka. Mierzona jest wzbudzona fluorescencja białka, pochodząca głównie z aromatycznych łańcuchów bocznych reszt tyrozyny i tryptofanu. W trakcie rozfałdowywania białka pod wpływem wzrastającej temperatury reszty te są eksponowane na działanie rozpuszczalnika, a tym samym następuje zmiana ich intensywności fluorescencji. Zależność między zmianami intensywności fluorescencji a gradientem temperatury wykorzystywana jest do wyznaczenia tzw. temperatury topnienia ( $T_m$ ). Wykorzystując analizę nanoDSF otrzymano tzw. krzywe termiczne, obrazujące proces denaturacji białka w zakresie temperatur 20 – 90 °C, opisujące przejście struktury białka ze stanu natywnego do stanu zdenaturowanego (Ryc. 70).



**Ryc. 70. Analiza biofizyczna parametrów strukturalnych kompleksów białek P z wykorzystaniem nanoDSF.** Wykres przedstawia krzywe opisujące proces denaturacji badanych białek monitorowany jako funkcja temperatury i stosunku wartości fluorescencji F350/F330 nm. Kolorami: niebieskim, czarnym, zielonym oraz czerwonym oznaczono kolejno dimery P1-P2, P1-P2 $\Delta$ C, P1 $\Delta$ C-P2 oraz P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C.

Analiza nanoDSF, to technika pozwalająca na ocenę stabilności makromolekuły poprzez monitorowanie zmian strukturalnych w zakresie zmian temperatury. Stosując nanoDSF wyznaczono tzw. temperatury topnienia białka tj. stanu, w którym połowa analizowanej

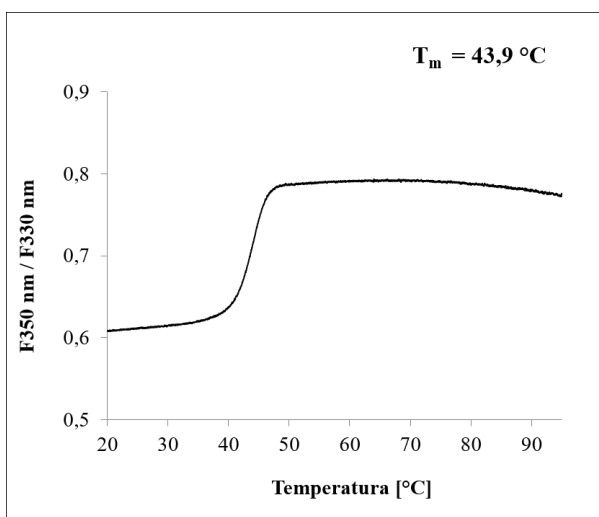


frakcji białka jest w stanie natywnym, a połowa jest w stanie zdenaturowanym. Na tej podstawie wyliczono punkty topnienia dla poszczególnych kompleksów -  $T_{m/2}$  (Tabela 4).

**Tabela 4.** Wyznaczone temperatury punktów topnienia dla poszczególnych kompleksów białek P.

<b>Kompleks białkowy</b>	<b><math>T_m</math> [°C]</b>
P1-P2	52,0
P1-P2 $_{\Delta C}$	53,1
P1 $_{\Delta C}$ -P2	55,0
P1 $_{\Delta C}$ -P2 $_{\Delta C}$	53,8
P2-P2	-
P2 $_{\Delta C}$ -P2 $_{\Delta C}$	-

Wyznaczony parametr biofizyczny -  $T_m$ , dla wszystkich analizowanych białek posiadał wysoką zgodność, co potwierdza wcześniejsze analizy CD, które wskazały, że białka te są poprawnie sfałdowane. Ponadto, krzywe denaturacyjne otrzymane w analizie nanoDSF posiadały charakterystyczny układ, wykazując dwuetapowe przejście, świadczący o tzw. kooperatywnym modelu procesu rozfałdowywania struktury dla białkowych kompleksów, tj. wszystkie analizowane białka posiadają jedną integralną domenę strukturalną, która ulega harmonijnemu rozfałdowaniu, a wyrazem tego jest dwuetapowe przejście od struktury natywnej do zdenaturowanej. Z uwagi na brak tryptofanu w strukturze białka P2, a co za tym idzie i w strukturze białka P2 $_{\Delta C}$  niemożliwe było wyznaczenie  $T_m$  dla kompleksów P2-P2 oraz P2 $_{\Delta C}$ -P2 $_{\Delta C}$ . Analogicznie, poddano analizie oceny stabilności termicznej w procesie termicznej denaturacji rekombinowane białko RTA (Ryc. 71).



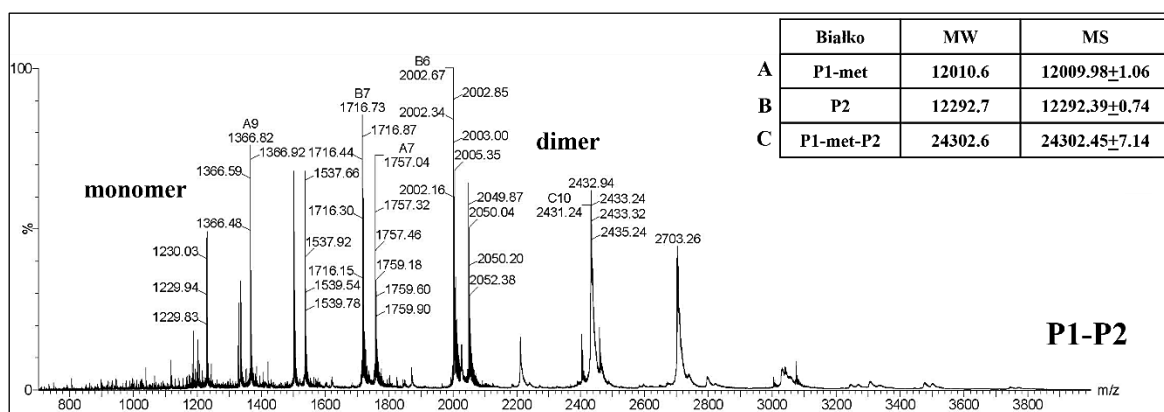
**Ryc. 71. Analiza biofizyczna parametrów strukturalnych RTA metodą nanoDSF.** Wykres przedstawia krzywą obrazującą proces denaturacji białka monitorowany jako funkcja temperatury i stosunku wartości fluorescencji  $F_{350}/F_{330 \text{ nm}}$ .  $T_m = 43,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Analiza nanoDSF rekombinowanego białka RTA pozwoliła na wyznaczenie wartości  $T_m$  na poziomie  $43,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Krzywa denaturacyjna posiada typowe przejście dwufazowe, od stanu natywnego do stanu pełnej denaturacji, wskazując że RTA jest białkiem posiadającym jedną niezależnie fałdującą się domenę, która konstryuuje RTA.

### 4.3 Spektrometria mas w warunkach niedenaturujących (*ang. native mass spectrometry*, „native”-MS)

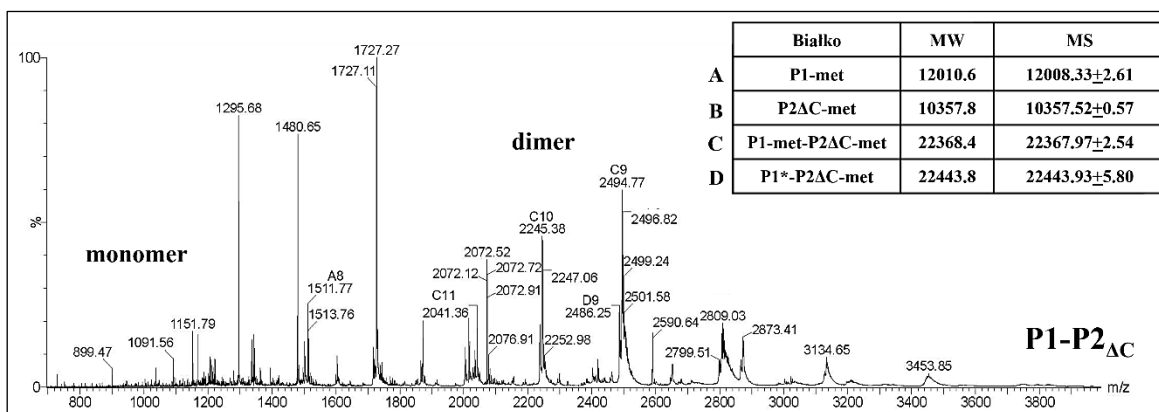
W kolejnym kroku badań biofizycznych przeprowadzono analizę masy molekularnej wszystkich otrzymanych kompleksów. Wykorzystano do tego technikę spektrometrii mas w warunkach niedenaturujących (*ang. native mass spectrometry*, „native”-MS), z zachowaniem parametrów analitycznych umożliwiających pomiar mas otrzymanych kompleksów (patrz: Materiały i Metody). W celu dostosowania próbek białkowych do wymaganych parametrów analitycznych spektrometru mas, we wszystkich frakcjach zawierających kompleksy białkowe dokonano wymiany buforu na 200 mM octan amonu (pH 7,5), używając do tego celu kolumn chromatograficznych Micro Bio-Spin (BioRad). Wszystkie pomiary były prowadzone w warunkach tzw. łagodnej jonizacji (patrz: Materiały i Metody), w wyniku czego możliwe było uzyskanie zjonizowanych cząsteczek, które utrzymywały parametry natywnych kompleksów w fazie gazowej. Zapewnienie łagodnych warunków jonizacji białka pozwoliło na pomiar masy kompleksów białkowych (Ryc. 73-78). Analiza masy molekularnej została wykonana dla wszystkich kompleksów.

Otrzymane widmo masowe kompleksu P1-P2, uzyskane metodą „native”-MS, wykazało, że w czasie analizy w fazie gazowej występowały dwa typy molekuł, tj. pojedyncze białka P jak i ich formy dimeryczne, co wskazało, że część kompleksów uległa dysocjacji podczas procesu jonizacji. Analiza mas molekularnych wykazała: 12009,98±1,06 Da dla monomeru białka P1, przy czym białko to pozbawione było metioniny (P1-met) oraz 12292,39±0,74 Da dla monomeru białka P2; 24302,45±7,14 Da dla heterodimeru P1-P2 z białkiem P1 pozbawionym metioniny (P1-met-P2). Wszystkie oznaczone eksperymentalnie masy molekularne były zgodne z wyliczonymi masami teoretycznymi dla poszczególnych monomerów białek P1, P2 oraz dimeru P1-P2 (Ryc. 72, tabela). Przy zastosowaniu identycznych warunków eksperymentalnych wykonano analizy dla pozostałych kompleksów białkowych.



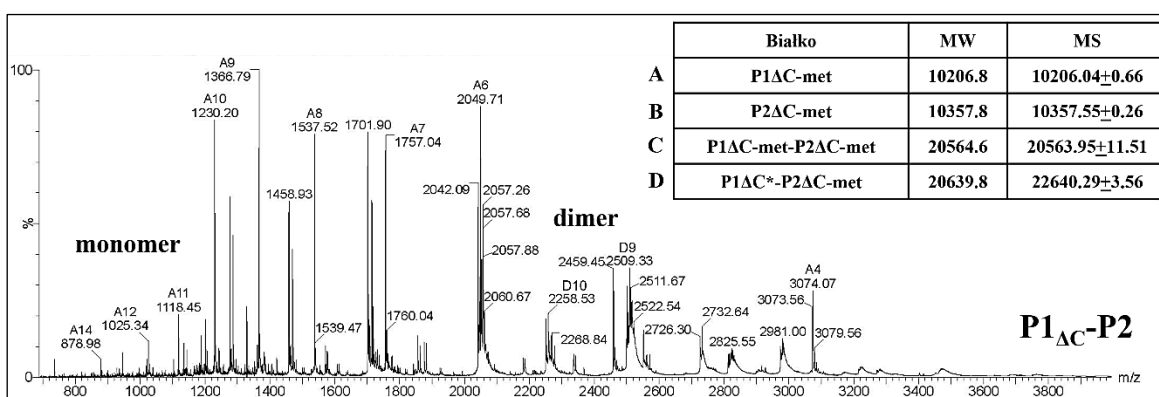
**Ryc. 72. Analiza masy molekularnej dimeru białek P1-P2.** Widmo masowe heterodimeru P1-P2 uzyskane metodą spektrometrii mas w warunkach natywnych („native”-MS) z wykorzystaniem jonizacji ESI. Do widma dołączono tabelę z masami obliczonymi przez dekonwolucję widm poszczególnych monomerów i dimerów białek (MS) otrzymanych metodą „native” MS oraz masami teoretycznymi obliczonymi na bazie sekwencji aminokwasowych (MW).

Otrzymane widmo masowe kompleksu P1-P2<sub>ΔC</sub> umożliwiło weryfikację masy molekularnej kompleksu jak i jego poszczególnych składowych (Ryc. 73, tabela). Masy białek w postaci monomerycznej korespondowały z analizą heterodimeru P1-P2. Na uzyskanym widmie masowym dla heterodimeru P1-P2<sub>ΔC</sub> zidentyfikowano sygnały, którym przyporządkowano masę 10357,52±0,57 Da, która to odpowiadała obliczonej teoretycznie masie dla monomeru białka P2<sub>ΔC</sub> pozbawionego pierwszej metioniny (P2<sub>ΔC</sub>-met). W analizowanej frakcji zidentyfikowano także kompleks o masie 22443,93±5,80 Da, który można było przypisać do heterodimeru P1-P2<sub>ΔC</sub>, w którym tylko białko P1 występuje w pełnej formie, zaś białko P2<sub>ΔC</sub> pozbawione jest pierwszej metioniny (P1\*-P2<sub>ΔC</sub>-met).



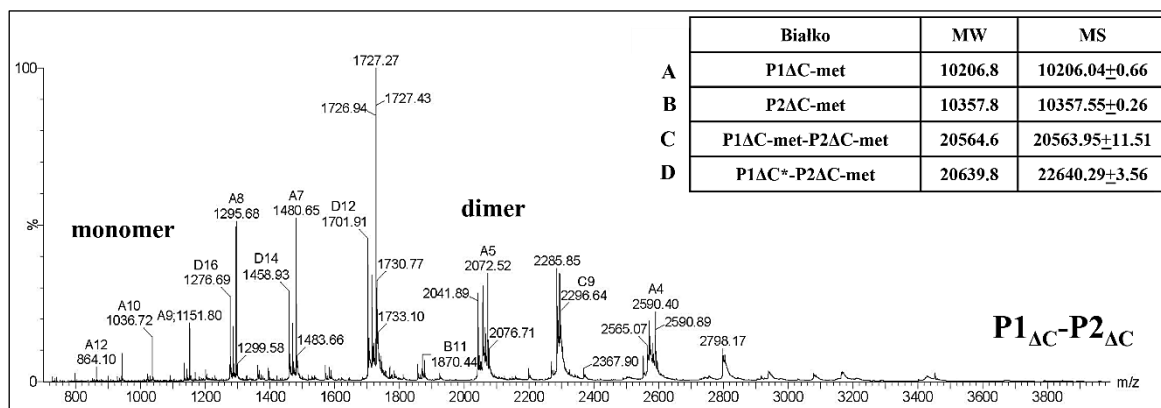
**Ryc. 73. Analiza mas molekularnych białek P formujących kompleks P1-P2<sub>ΔC</sub>.** Widmo masowe heterodimeru P1-P2<sub>ΔC</sub> uzyskane metodą spektrometrii mas w warunkach natywnych („native” MS) z wykorzystaniem jonizacji ESI. Do widma dołączono tabelę z masami obliczonymi przez dekonwolucję widm poszczególnych monomerów i dimerów białek (MS) otrzymanych metodą „native” MS oraz masami teoretycznymi obliczonymi na bazie sekwencji aminokwasowych (MW). Gwiazdką (\*) oznaczono kompleks, w którym tylko białko P1 występuje w pełnej formie i posiada pierwszą metioninę.

Podobnie jak w powyższych analizach, w przypadku kompleksu P1<sub>ΔC</sub>-P2 uzyskane widmo masowe również pozwoliło na precyzyjną identyfikację oraz przyporządkowanie mas molekularnych poszczególnych białek monomerycznych. Wydrębiono także sygnały odpowiadające masom form dimerycznych: 22497,71±51 Da dla heterodimeru P1<sub>ΔC</sub>-P2, w którym białko P1 nie posiada metioniny (P1<sub>ΔC</sub>-met-P2) oraz 22577,29±6,83 Da dla heterodimeru P1<sub>ΔC</sub>\*-P2 w którym białka P posiadają N-terminalną metioninę (Ryc. 74, tabela).



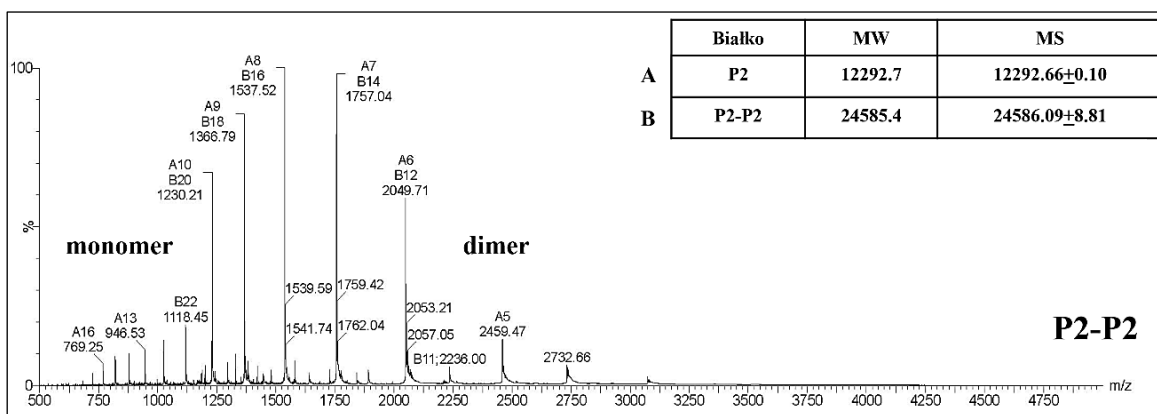
**Ryc. 74. Analiza mas molekularnych dimerów białek P1<sub>ΔC</sub>-P2.** Widmo masowe heterodimeru P1<sub>ΔC</sub>-P2 uzyskane metodą spektrometrii mas w warunkach natywnych („native” MS) z wykorzystaniem jonizacji ESI. Do widma dołączono tabelę z masami obliczonymi przez dekonwolucję widm poszczególnych monomerów i dimerów białek (MS) otrzymanych metodą „native” MS oraz masami teoretycznymi obliczonymi na bazie sekwencji aminokwasowych (MW). Gwiazdką (\*) oznaczono kompleks, w którym tylko białko P1ΔC występuje w pełnej formie i posiada pierwszą metioninę.

Widmo masowe kompleksu P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C, oprócz identyfikacji mas molekularnych poszczególnych form monomerycznych, pozwoliło na przyporządkowanie poszczególnym sygnałom mas molekularnych odpowiadającym formom dimerycznym: 20563,95±11,51 Da dla heterodimeru P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C, w którym oba białka P pozbawione są N-terminalnej metioniny (P1 $\Delta$ -met-P2 $\Delta$ C-met) oraz 22640,29±3,56 Da dla heterodimeru P1 $\Delta$ C\*-P2 $\Delta$ C, w którym tylko białko P2 $\Delta$ C pozbawione jest N-terminalnej metioniny (P1 $\Delta$ C\*-P2 $\Delta$ C-met), (Ryc. 75, tabela).



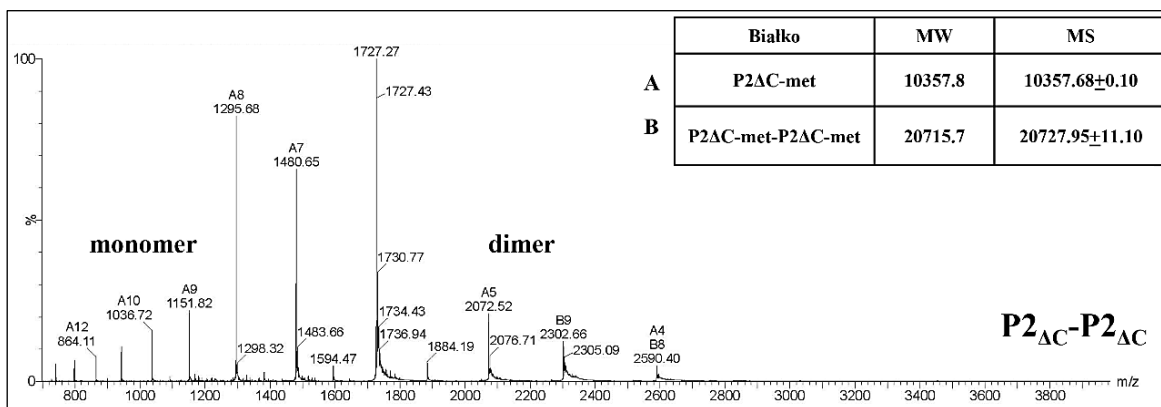
**Ryc. 75. Analiza mas molekularnych dimerów białek P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C.** Widmo masowe heterodimeru P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C uzyskane metodą spektrometrii mas w warunkach natywnych („native” MS) z wykorzystaniem jonizacji ESI. Do widma dołączono tabelę z masami obliczonymi przez dekonwolucję widm poszczególnych monomerów i dimerów białek (MS) otrzymanych metodą „native” MS oraz masami teoretycznymi obliczonymi na bazie sekwencji aminokwasowych (MW). Gwiazdką (\*) oznaczono kompleks, w którym tylko białko P1 $\Delta$ C występuje w pełnej formie i posiada pierwszą metioninę.

Analogicznie wykonano analizę metodą „native”-MS dla kompleksu homodimeru P2-P2 (Ryc. 76, tabela). Uzyskane widmo masowe pozwoliło na przyporządkowanie poszczególnym sygnałom mas molekularnych dla białka P2. Masa formy monomerycznej białka P2 była zgodna z uzyskanymi wynikami analiz przeprowadzonych dla heterodimerów. Zidentyfikowano także masę, którą przyporządkowano kompleksowi homodimeru P2-P2 (24586,09±8,81 Da).



**Ryc. 76. Weryfikacja mas molekularnych dimerów białek P2-P2.** Widmo masowe heterodimeru P2-P2 uzyskane metodą spektrometrii mas w warunkach natywnych („native” MS) z wykorzystaniem jonizacji ESI. Do widma dołączono tabelę z masami obliczonymi przez dekonwolucję widm poszczególnych monomerów i dimerów białek (MS) otrzymanych metodą „native” MS oraz masami teoretycznymi obliczonymi na bazie sekwencji aminokwasowych (MW).

Ponadto, uzyskano widmo masowe dla kompleksu P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> i ustalono masę dla homodimeru P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> (20727,95±11,10 Da), w którym oba białka P2<sub>ΔC</sub> pozbawione były N-terminalnej metony; opisane jako P2<sub>ΔC</sub>-met-P2<sub>ΔC</sub>-met (Ryc. 77).



**Ryc. 77. Weryfikacja mas molekularnych dimerów białek P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>.** Widmo masowe heterodimeru P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> uzyskane metodą spektrometrii mas w warunkach natywnych („native” MS) z wykorzystaniem jonizacji ESI. Do widma dołączono tabelę z masami obliczonymi przez dekonwolucję widm poszczególnych monomerów i dimerów białek (MS) otrzymanych metodą „native” MS oraz masami teoretycznymi obliczonymi na bazie sekwencji aminokwasowych (MW).

Jako podsumowanie, w tabeli 5 przedstawiono wyniki pomiarów mas molekularnych wszystkich kompleksów białkowych, które zostały otrzymane na bazie oczyszczonych

białek rekombinowanych P1, P2 oraz ich form delecyjnych [187]. Analiza spektrometrii mas w warunkach niedenaturacyjnych pokazała, że wyznaczone masy molekularne otrzymanych białek rekombinowanych odpowiadają masom teoretycznym obliczonym na bazie sekwencji aminokwasowej, co wskazuje, że białka te posiadają właściwą strukturę pierwszorzędową. Jednakże zanotowano, że pewna frakcja białek P1, P2 jak i ich form delecyjnych pozbawiona jest reszty metioninowej; zjawisko to jest związane z często występującą posttranslacyjną modyfikacją białek w komórkach *E. coli*, polegającą na usunięciu N-końcowej metioniny przez enzym aminopeptydazę metioninową [68,187]. Analiza „native-MS” pozwoliła na oznaczenie masy kompleksów, a wyniki eksperymentalne korelowały z danymi teoretycznymi obliczonymi na podstawie sekwencji aminokwasowych.

**Tabela 5.** Porównanie mas molekularnych badanych kompleksów białek uzyskanych metodą natywnej spektrometrii mas z teoretycznymi masami cząsteczkowymi [187].

<b>Kompleks białkowy</b>	<b>Masa cząsteczkowa [Da]</b>	<b>Masa uzyskana w wyniku analizy native MS [Da]</b>
P1-met	12010,6	12009,98±06
P1 <sub>ΔC</sub> -met	10357,8	10357,52±0,57
P2	12292,7	12292,66±0,10
P2 <sub>ΔC</sub> -met	10357,8	10357,68±0,10
P1-met-P2	24302,6	24302,45±7,14
P1-met-P2 <sub>ΔC</sub> -met	22368,4	22367,97±2,54
P1-met-P2 <sub>ΔC</sub> -met	22368,4	22367,97±2,54
P1 <sub>ΔC</sub> -met-P2	22499,5	22497,71±5,11
P1 <sub>ΔC</sub> -met-P2 <sub>ΔC</sub> -met	20564,6	20563,95±11,51
P2-P2	24585,4	24586,09±8,81
P2 <sub>ΔC</sub> -met-P2 <sub>ΔC</sub> -met	20715,7	20727,95±11,10

W zakresie analizy „native”-MS wyznaczono także masę molekularną rekombinowanego białka RTA, wykorzystując frakcję białkową otrzymana na drodze oczyszczania z wykorzystaniem chromatografii SEC. Eksperymentalna masa molekularna RTA wyniosła  $31337,85 \pm 0,60$  Da i była zbliżona do teoretycznej obliczonej masy 31412,4 Da. Podobnie jak w przypadku białek P, różnica w masie była związana z usunięciem reszty metioniny na N-terminalnym fragmencie RTA.

## 5. Analiza interakcji dimerów białek P1-P2 z katalityczną podjednostką rycyny

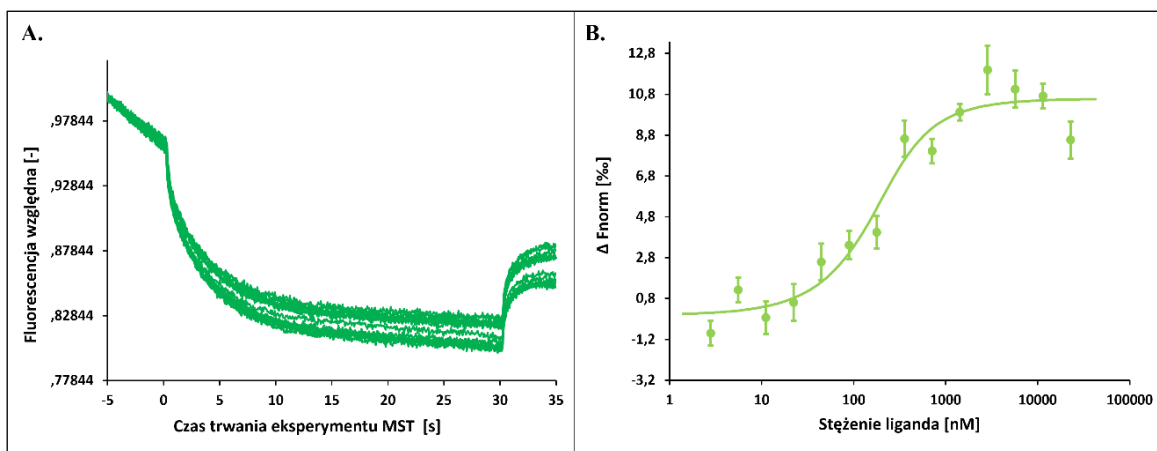
Dysponując przygotowanymi kompleksami białkowymi, zainicjowano badania mające na celu opisanie interakcji między dimerami ludzkich białek P a cząsteczką RTA, a przede wszystkim wskazanie roli C-terminalnego elementu białek P w interakcji z RTA. Mając do dyspozycji opracowany materiał badawczy, tj. zestaw kompleksów białkowych oraz RTA, następnym krokiem była analiza interakcji. W tym celu wykorzystano dwie metody analityczne: termoforezę mikroskalową (ang. *Microscale Thermophoresis*, MST) oraz metodę interferometrii biowarstwowej (ang. *bio-layer interferometry*, BLI). Pierwsza z nich pozwala na określenie parametrów interakcji (w formie stałej wiązania  $K_D$ ), wykorzystując zjawisko ruchu cząsteczek w gradiencie temperatury, zależnego od różnych właściwości takich jak wielkość, ładunek, powłoka hydratacyjna czy konformacja. Rejestracja ruchu cząsteczek w zależności od zmian biofizycznych badanych molekuł pozwala na wyznaczenie  $K_D$ . Druga metoda, umożliwia pomiar kinetyki interakcji biomolekularnych oraz wyznaczanie wartości  $K_D$ .

### 5.1 Termoforeza mikroskalowa (ang. *microscale thermophoresis*, MST)

Otrzymane i scharakteryzowane preparaty kompleksów białkowych P1-P2 oraz RTA poddano analizie interakcji białko-białko metodą termoforezy mikroskalowej MST w celu opisanie tzw. wzajemnych zależności molekularnych między tymi biomolekułami poprzez wyznaczenie stałej wiązania  $K_D$ . Analizę wykonano w następującej konfiguracji: białko RTA wykorzystano jako molekułę, która została wyznakowana fluorescencyjnie barwnikiem NT-647, zaś poszczególne dimery białek P zostały użyte jako tzw. analit, tj. zastosowano ich różne stężeniach, w celu przeprowadzenia tzw. miareczkowania kompleksami białek P1-P2 partnera białkowego jakim jest RTA (Ryc. 78-83). W wyniku przeprowadzonych analiz MST uzyskano szereg krzywych opisujących fluktuację intensywności fluorescencji RTA w stosunku do poszczególnych stężeń kompleksów białkowych (panele A, do Ryc. 78-83). Na bazie danych analitycznych, wykreślono następnie wykres będący funkcją zmian fluorescencji w stosunku do poszczególnych stężeń analitu (liganda) co pozwoliło otrzymać wartość stałej dysocjacji  $K_D$  (Panele B, do Ryc. 78-83). Korzystając z tej konfiguracji eksperymentalnej w pierwszej analizie jako analit

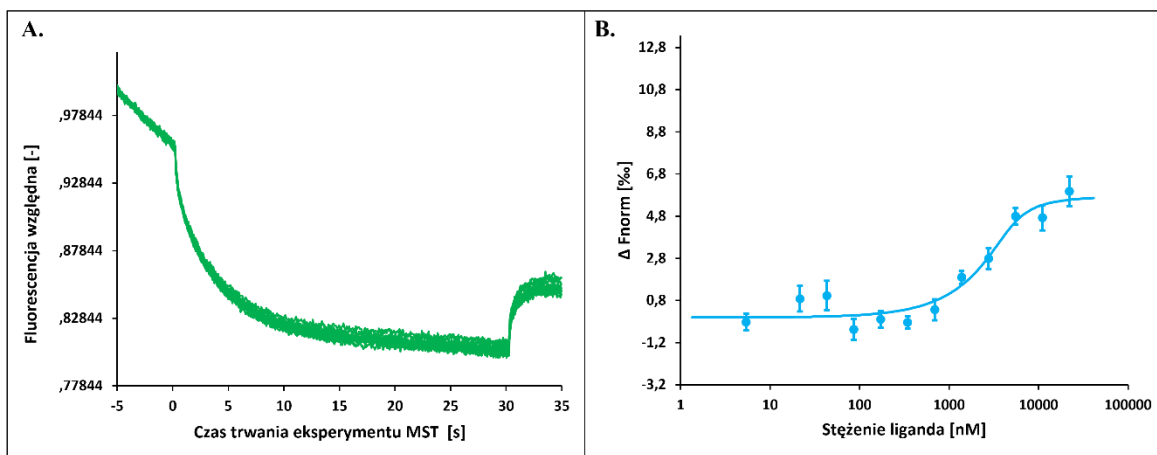


wykorzystano heterodimer P1-P2; otrzymując wartość stałej dysocjacji  $K_D=86$  nM (Ryc. 78).



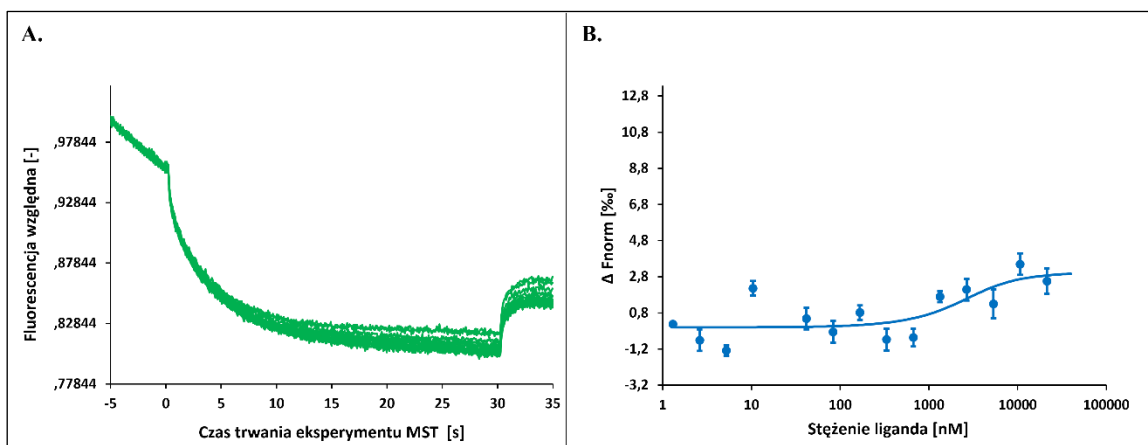
**Ryc. 78. Analiza interakcji kompleksu P1-P2 z RTA.** A. Wykres obrazujący dane eksperymentalne opisujące zmianę fluorescencji względnej RTA dla kolejnych 16 rozcieńczeń analitu. B. Wykres opisujący zależności zmian fluorescencyjnych od stężenia liganda. Wyznaczona stała  $K_D=86$  nM. Słupki błędów  $\pm$  SE (n=3).

Następnie wykonano analizę interakcji heterodimeru delecyjnego P1-P2 $\Delta$ C, dla którego wyznaczona wartość  $K_D$  była około sześciokrotnie wyższa niż w przypadku heterodimeru P1-P2:  $K_D \sim 533$  nM (Ryc. 79):



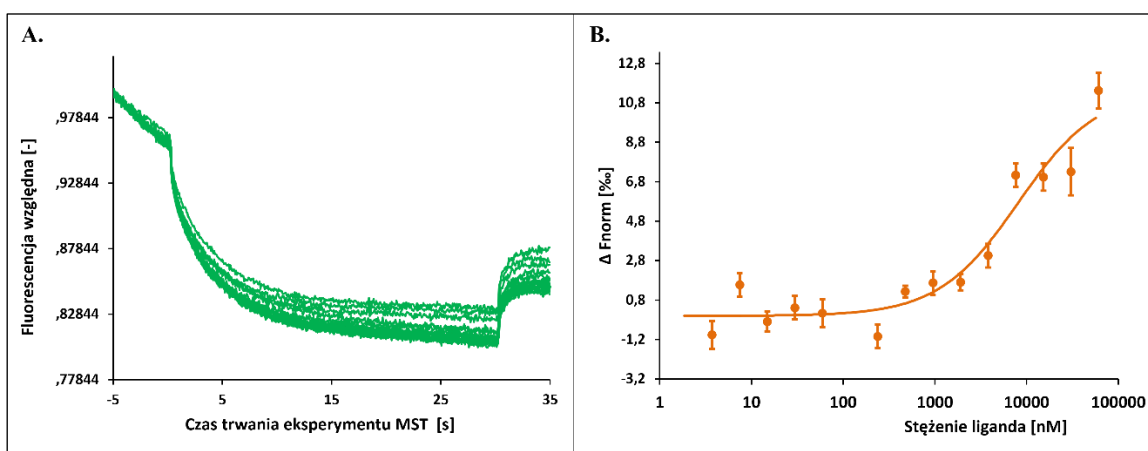
**Ryc. 79. Analiza interakcji kompleksu P1-P2 $\Delta$ C z RTA.** A. Wykres obrazujący dane eksperymentalne opisujące zmianę fluorescencji względnej RTA dla kolejnych 16 rozcieńczeń analitu. B. Wykres zależności zmian fluorescencyjnych od stężenia liganda. Wyznaczona stała  $K_D=533 \pm 1198$  nM. Słupki błędów  $\pm$  SE (n=3).

Kolejnym kompleksem poddanym analizie interakcji był kompleks P2-P2, który wykazywał niską, ale wciąż specyficzną interakcję z RTA, o wartości  $K_D$  w zakresie 1–2  $\mu$ M (Ryc. 80).



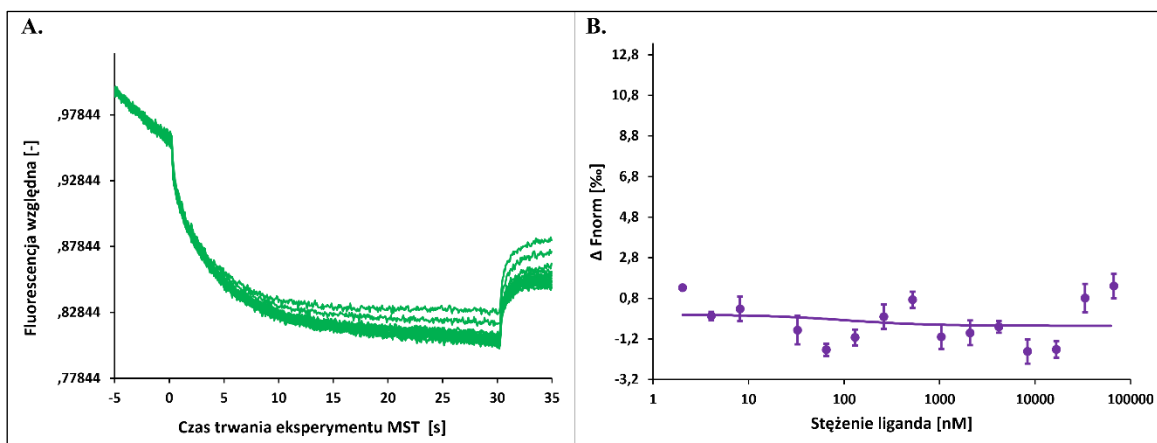
**Ryc. 80. Analiza interakcji kompleksu P2-P2 z RTA.** A. Wykres obrazujący dane eksperymentalne opisujące zmianę fluorescencji względnej RTA dla kolejnych 16 rozcieńczeń analitu. B. Wykres zależności zmian fluorescencyjnych od stężenia liganda. Wyznaczona stała  $K_D=1276\pm 7150$  nM. Słupki błędów  $\pm$  SE (n=3).

W przypadku heterodimeru delecyjnego, P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C, zaobserwowano niski poziom interakcji kompleksu z cząsteczką RTA, ze stałą dysocjacji na poziomie  $K_D \sim 8,1$   $\mu$ M (Ryc. 81).

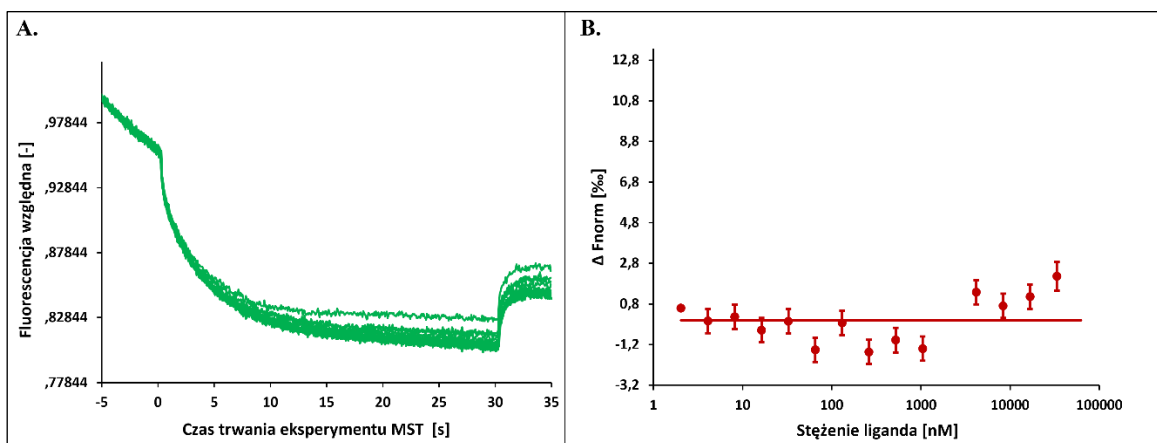


**Ryc. 81. Analiza interakcji kompleksu P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C z RTA.** A. Wykres obrazujący dane eksperymentalne opisujące zmianę fluorescencji względnej RTA dla kolejnych 16 rozcieńczeń analitu. B. Wykres zależności zmian fluorescencyjnych od stężenia liganda. Wyznaczona stała  $K_D=8099\pm 3922$  nM. Słupki błędów  $\pm$  SE (n=3).

Interesujące wyniki otrzymano, gdy zastosowano układ eksperymentalny RTA z heterodimerem P1 $\Delta$ C-P2 czy z homodimerem P2 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C, mianowicie nie zaobserwowano oddziaływań, a co za tym idzie, dla tych układów nie było możliwe wyznaczenie parametru stałej dysocjacji (Ryc. 82-83).

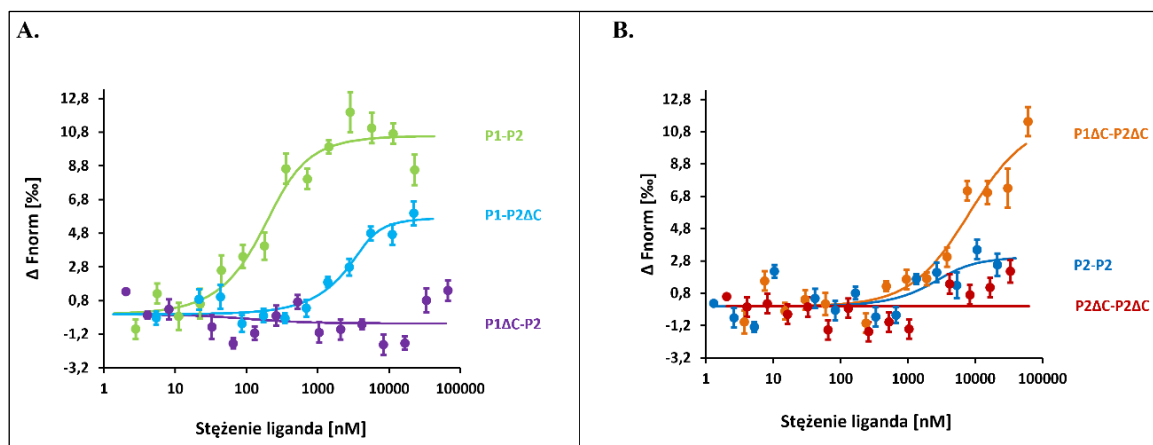


**Ryc. 82. Analiza interakcji kompleksu P1<sub>AC</sub>-P2 z RTA.** **A.** Wykres obrazujący dane eksperymentalne opisujące zmianę fluorescencji względnej RTA dla kolejnych 16 rozcieńczeń analitu. **B.** Wykres zależności zmian fluorescencyjnych od stężenia liganda. Słupki błędów ± SE (n=3).



**Ryc. 83. Analiza interakcji kompleksu P2<sub>AC</sub>-P2<sub>AC</sub> z RTA.** **A.** Wykres obrazujący dane eksperymentalne opisujące zmianę fluorescencji względnej RTA dla kolejnych 16 rozcieńczeń analitu. **B.** Wykres zależności zmian fluorescencyjnych od stężenia liganda. Słupki błędów ± SE (n=3).

W celu zobrazowania różnic w oddziaływaniu poszczególnych kompleksów z RTA wykonane zostało zestawienie wyników analiz MST. W tym celu wykorzystano wykresy obrazujące wzajemne relacje między parametrami interakcji RTA ze wszystkimi kompleksami białkowymi, tj. będące funkcją zmian fluorescencji w stosunku do stężenia kompleksu białek P (Ryc. 84).

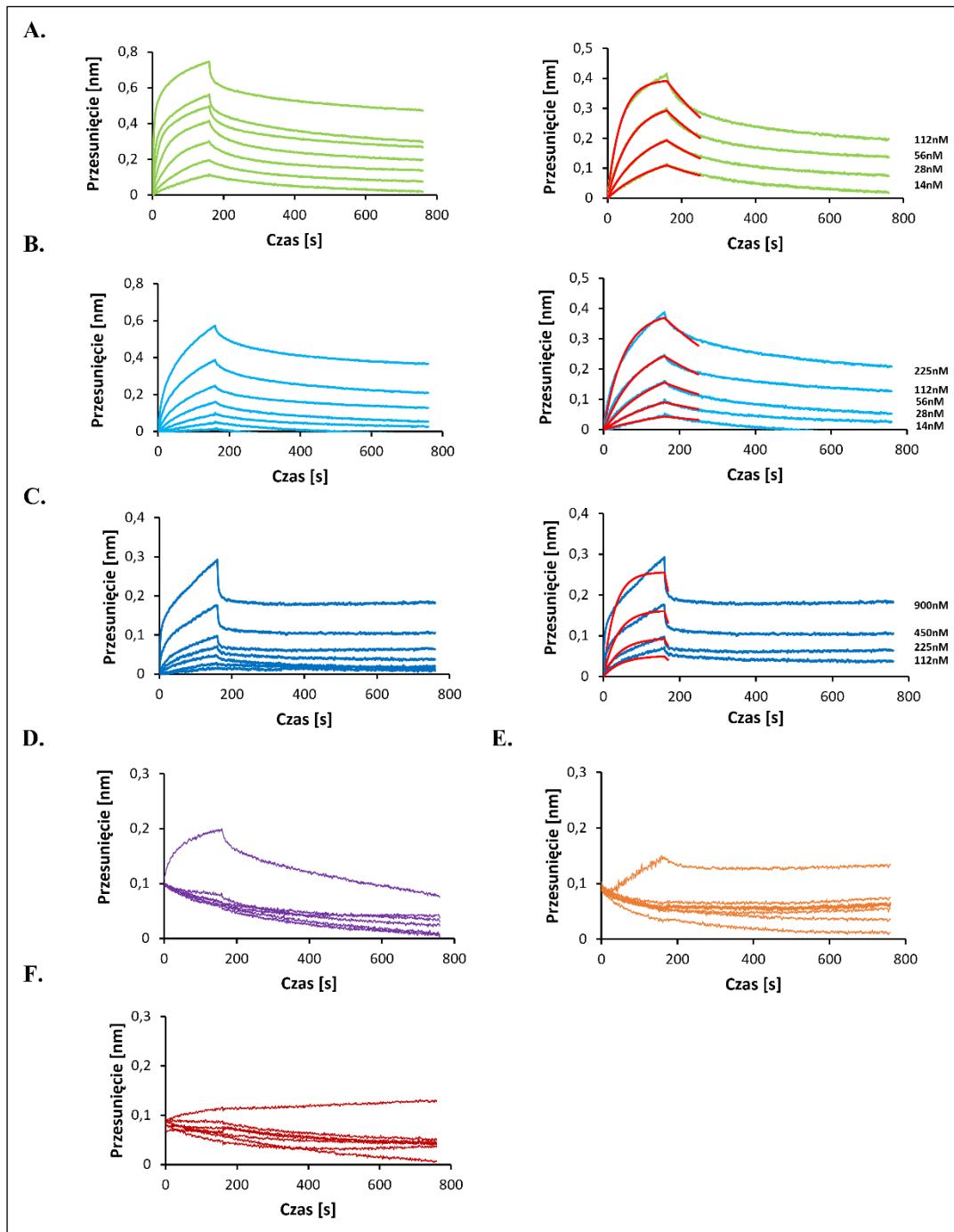


**Ryc. 84. Zestawienie krzywych opisujących zakres interakcji RTA z kompleksami rybosomalnych białek P z wykorzystaniem metody MST.** A. Krzywe będące funkcją zmian fluorescencji w zakresie znakowanego białka RTA i stężenia poszczególnych kompleksów: P1-P2, P1-P2 $\Delta$ C, P1 $\Delta$ C-P2. B. Wykorzystane kompleksy: P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C, P2-P2, P2 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C. Poszczególne kompleksy zostały oznaczone kolorami wykorzystanymi na poprzednich wykresach, odpowiednio: dla kompleksu P1-P2 – kolorem jasnozielonym, dla kompleksu P1-P2 $\Delta$ C – kolorem turkusowym, dla kompleksu P1 $\Delta$ C-P2 – kolorem fioletowym, dla kompleksu P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C – kolorem pomarańczowym, dla kompleksu P2-P2 – kolorem niebieskim, dla kompleksu P2 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C – kolorem czerwonym. Wartość  $\Delta F_{norm}$ , opisuje zmiany względnej fluorescencji znakowanego białka RTA. Słupki błędów  $\pm$  SE (n=3).

Otrzymane dane wskazują, że dimer P1-P2 reprezentuje najkorzystniejszą formę strukturalną rozpoznawaną przez RTA, z powinowactwem w zakres nanomolowy; co ważne, udział poszczególnych fragmentów C-końcowych w wiązaniu RTA jest nierównocenny z kluczowym udziałem fragmentu C-terminalnego białka P1, podczas gdy ten sam fragment białka P2 nie odgrywa ważnej roli. Ponadto, na uwagę zasługuje fakt, że heterodimer pozbawiony wszystkich C-końców także posiada potencjał do wiązania RTA, jednakże z niskim powinowactwem, co sugeruje, że nie tylko C-terminalny element białek P1 jest miejscem wiązania RTA do heterodimeru. Zaskakujący wynik otrzymano wykorzystując homodimer P2-P2, który nie był w stanie oddziaływać z RTA, mimo że białko P2 posiada dwa identyczne końce C-terminalne jak białko P1. Różnice w powinowactwie RTA do poszczególnych kompleksów można wyjaśnić nietypową konfiguracją domeny CTD białka P1 oraz unikalną konfiguracją N-terminalnej domeny P1-P2, która wydaje się wspomagać wiązanie RTA do heterodimeru P1-P2.

## 5.2 Interferometria bio-warstwowa (*ang. bio-layer interferometry, BLI*)

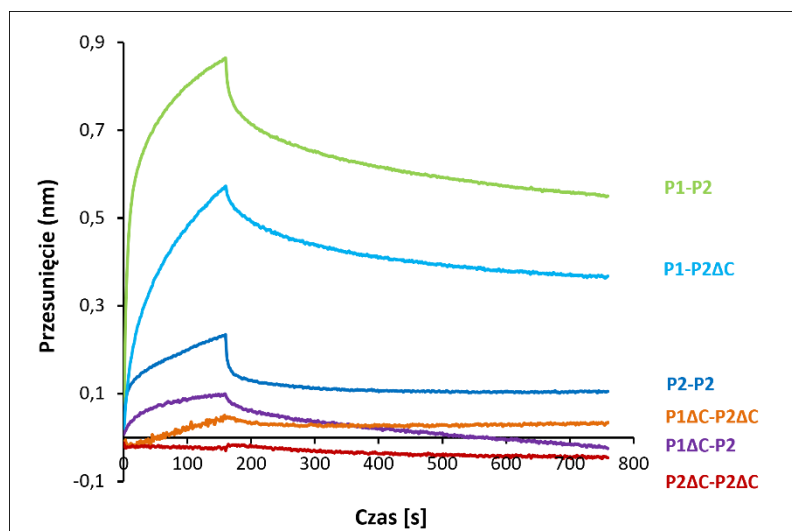
Analiza MST wykazała, że kluczowym elementem w interakcji kompleksu białek P1-P2 jest część C-terminalna białka P1, zaś C-terminalny fragment białka P2 odgrywa mniej znaczącą rolę, jak ustalono w oparciu o wyznaczone stałe dysocjacji. Aby zweryfikować parametry uzyskane podczas analizy interakcji między RTA a dimerami białek P metodą MST, interakcję RTA z dimerami P1-P2 zbadano za pomocą techniki BLI. W tym podejściu analitycznym RTA immobilizowano na powierzchni czujnika wykorzystując tzw. etykietę histydynową (10xHis-tag) a kompleksy białek P1-P2 zastosowano jako analit w różnych stężeniach. W zakresie analiz BLI, możliwe jest także opisanie kinetyki wiązania ( $k_{on}$ ) i dysocjacji ( $k_{off}$ ) kompleksów, co pozwoliło otrzymać szereg krzywych opisujących kinetykę interakcji RTA w stosunku do serii stężeń dimerów P1-P2 (Ryc. 85).



**Ryc. 85. Analiza interakcji między RTA a dimerami ludzkich rybosomalnych białek P z wykorzystaniem metody BLI [171].** Na wykresach przedstawiono krzywe obrazujące kinetykę interakcji kompleksów w zakresie różnych stężeń z cząsteczką RTA; **A.** P1-P2; **B.** P1-P2<sub>ΔC</sub>; **C.** P2-P2; **D.** P1<sub>ΔC</sub>-P2; **E.** P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>; **F.** P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>. Panele lewe przedstawiają krzywe wiązania dla serii stężeń analitu przy 0, 14, 28, 56, 112, 225, 450 i 900 nM. Panele prawe przedstawiają reprezentatywne krzywe analityczne wraz z krzywymi przedstawiającymi model interakcji z najwyższą wartością współczynnika R<sup>2</sup>. Sensogramy są oznaczone liniami zielonymi (kompleks P1-P2), turkusowymi (kompleks P1-P2<sub>ΔC</sub>) oraz granatowymi (kompleks P2-P2), a odpowiadające im dopasowanie do modelu 1:1 liniami czerwonymi. Przedstawione wyniki reprezentują średnie wartości uzyskane na drodze trzech niezależnych eksperymentów.

Analiza BLI wykazała, że dimer P1-P2 jest najlepszym partnerem dla RTA, zaś nie zaobserwowano interakcji dla RTA z heterodimerami P1<sub>ΔC</sub>-P2 i P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> ani z homodimerem P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>, a co za tym idzie, dla tych kompleksów nie było możliwe wyznaczenie kinetyki reakcji oddziaływania z RTA (Ryc. 85. D-F). Dla pozostałych analizowanych kompleksów białkowych przedstawiono reprezentatywne krzywe kinetyczne otrzymane dla poszczególnych dimerów o stężeniu 112 nM (Ryc. 86). Wykorzystując zaimplementowane oprogramowanie systemu OCTET 96 RED (ForteBio, Pall, UK) zastosowano model matematyczny opisujący uzyskane dane eksperymentalne w formie krzywych kinetyki interakcji, co umożliwiło obliczenie parametrów kinetycznych reakcji, w postaci stałej szybkości asocjacji i dysocjacji (wartości  $k_{on}$  [ $M^{-1}s^{-1}$ ] oraz  $k_{off}$  [ $s^{-1}$ ]), (Tabela 6). Mając do dyspozycji uzyskane wartości  $k_{on}$  i  $k_{off}$ , obliczono wartość stałej równowagi reakcji dysocjacji  $K_D$  będącej stosunkiem  $k_{off}/k_{on}$ . Obliczona stała  $K_D$  dla heterodimeru P1-P2 wyniosła 21 nM, co potwierdziło uzyskane w trakcie analiz metodą MST wyniki świadczące o najwyższej specyficzności dla interakcji RTA z dimerem P1-P2 posiadającym pełne domeny CTD (Ryc. 86; Tabela 6). Kinetyka wiązania RTA z kompleksem P1-P2<sub>ΔC</sub>, w którym to białko P2 było pozbawione konserwatywnego fragmentu C-końcowego, także wykazywała wysoką specyfikę/swoistość, ale o wartości stałej  $K_D$  niższej niż w przypadku interakcji RTA z pełnym dimerem, na poziomie 90 nM (Ryc. 86, Tabela 6), co potwierdzało by, że kluczowym elementem w wiązaniu RTA do dimeru białek P jest C-koniec białka P1. Delecja 16-tu C-terminalnych aminokwasów białka P2 wpłynęła na obniżenie szybkości asocjacji ( $k_{on}$ ) RTA z P1-P2<sub>ΔC</sub> ( $k_{on}=3,54\pm 0,04 \times 10^4$ ) przy porównaniu z pełnym heterodimerem P1-P2 ( $k_{on}=1,75\pm 0,39 \times 10^5$ ), co sugeruje, że brak CTD białka P2 nieco obniża powinowactwo. Dobitny przykład nierównocенności C-końcowych domen białek P1 i P2 to wynik analizy kinetyki interakcji RTA z dimerem P1<sub>ΔC</sub>-P2, dla którego niemożliwym było wyznaczenie stałej szybkości asocjacji i dysocjacji, a co za tym idzie stałej równowagi reakcji dysocjacji (Ryc. 86, Tabela 6), wskazując że CTD białka P1 jest kluczowym elementem kotwiczącym RTA do kompleksu. Analizie BLI poddano także homodimer P2-P2, który wykazał bardzo niski poziom interakcji, w zakresie  $K_D=2 \mu M$  (Ryc. 86, Tabela 6). Bardzo niska specyfika oddziaływań między RTA a homodimerem P2-P2 sugeruje, że organizacja strukturalna homodimeru uniemożliwia efektywne wiązanie RTA, a tym samym potwierdza fakt, że nie on jest formą biologicznie aktywną w kontekście jego roli na rybosomie jako elementu centrum GTPazowego. Analiza wiązania RTA z mutantami z podwójną delecją, tj. z kompleksem P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> oraz P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> wskazała, że praktycznie nie zanotowano efektywnej interakcji, co również potwierdzało

bezpośredni udział domen CTD białek P1 i P2 w interakcji z RTA, a w szczególności istotności domeny C-terminalnej białka P1 (Ryc. 86; Tabela 6).



**Ryc. 86. Wykres wybranych reprezentatywnych krzywych opisujących kinetykę interakcji RTA z poszczególnymi kompleksami.** Krzywe obrazujące interakcję poszczególnych kompleksów rybosomalnych białek P1/P2 z katalityczną podjednostką rycyny (RTA). Reprezentatywne krzywe asocjacji/dysocjacji pokazano dla dimerów o stężeniu 112 nM.

**Tabela 6.** Parametry kinetyczne interakcji RTA z kompleksem ludzkich białek P

Kompleks białkowy	$K_D$ ( $M^{-1}$ )	$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $s^{-1}$ )
P1-P2	$(2,18 \pm 0,24) \times 10^{-8}$	$(1,75 \pm 0,39) \times 10^5$	$(3,71 \pm 0,45) \times 10^{-3}$
P1-P2 $\Delta$ C	$(9,03 \pm 0,17) \times 10^{-8}$	$(3,54 \pm 0,04) \times 10^4$	$(3,19 \pm 0,04) \times 10^{-3}$
P1 $\Delta$ C-P2	nd	nd	nd
P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C	nd	nd	nd
P2-P2	$(2,19 \pm 0,97) \times 10^{-6}$	$(1,72 \pm 0,09) \times 10^4$	$(3,85 \pm 1,87) \times 10^{-2}$
P2 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C	nd	nd	nd

Interakcje analizowano metodą interferometrii bio-warstwowej. Wartości  $K_D$ ,  $k_{on}$  i  $k_{off}$  reprezentują uśrednione wyniki otrzymane w wyniku przeprowadzenia trzech powtórzeń eksperymentu. Skrótem nd (ang. *not determined*) opisano dimery, dla których nie było możliwości określenia wartości danych kinetycznych interakcji.



Analiza BLI wskazała, że dimer P1-P2 reprezentuje najkorzystniejszą formę strukturalną rozpoznawaną przez RTA, z wysokim powinowactwem wiązania w zakresie nanomolowym. Analizy z użyciem form delecyjnych pozwoliły na wskazanie nierównocennej roli konserwatywnego fragmentu domeny CTD białek P1 i P2 w interakcji z RTA, z kluczowym udziałem domeny CTD białka P1. Co więcej, rezultaty uzyskane w wyniku analizy BLI były zgodne z wynikami uzyskanymi w analizach MST, wskazując że natywna niezmieniona struktura heterodimeru P1-P2 jest optymalnym układem biologicznym kotwiczącym RTA.

## V. DYSKUSJA

Rybosom jako centralny element maszynierii translacyjnej jest przedmiotem zainteresowania wielu zespołów naukowców z całego świata. W celu opracowania modelu funkcjonowania rybosomu na poziomie molekularnym przeprowadzono liczne analizy strukturalne, biochemiczne oraz biofizyczne, co zaowocowało opisaniem translacji na poziomie molekularnym [198]. Wśród wielu istotnych dla funkcjonowania rybosomu elementów, można wymienić trzy zasadnicze centra aktywne: centrum dekodujące, centrum peptydylotransferazy oraz centrum GTPazowe (ang. *GTP associated centre*, GAC). Tym, co zwraca uwagę w zakresie wspomnianych centrów jest fakt, że w przeciwieństwie do centrum peptydylotransferazy czy centrum dekodującego (działającym wyłącznie na bazie rRNA), działanie GAC jest efektem współdziałania rRNA oraz białek [198]. Jak wykazano, efektem owej „współpracy” jest szereg interakcji z białkowymi czynnikami zewnętrznymi takimi jak m.in. translacyjne GTPazy, które wspomagają rybosom i zwiększają jego procesywność. W obrębie centrum GTPazowego zidentyfikowano intrygującą strukturę zwaną „kciukiem” rybosomalnym. Struktura ta jest uważana za jeden z głównych funkcjonalnych elementów GAC, z uwagi na jej szczególną rolę - jest ona odpowiedzialna za rekrutację translacyjnych GTPaz (ang. *translational GTPases*, trGTPazy) takich jak czynniki elongacyjne oraz za stymulowanie, zależnej od czynników translacyjnych, hydrolizy GTP niezbędnej do procesu translacji. Eukariotyczny „kciuk” rybosomalny jest kompleksem białkowym formowanym przez konserwatywne białko uL10 oraz unikalne dla eukariontów białka P1 i P2. Białka te tworzą pentameryczny kompleks o konfiguracji  $uL10(P1-P2)_2$  [167]. Podstawę „kciuka” tworzy białko uL10, do którego przyłączone są dimery białek P1 i P2. Białka P preferencyjnie tworzą heterodimer P1-P2, który można uznać za centralny element funkcjonalny centrum GTPazowego na rybosomie [104, 107, 196, 197]. Białka P stanowią unikalny element w grupie wszystkich białek wchodzących w skład rybosomu, ponieważ w przeciwieństwie do pozostałych białek rybosomalnych, występują w komórce w wielu kopiach [98]. Ponadto, ich wyjątkową, charakterystyczną cechą, odróżniającą je od większości białek rybosomalnych mających charakter zasadowy, jest fakt, że białka P są tzw. białkami kwaśnymi, posiadając punkt izoelektryczny na poziomie ok. 4 [101,199,200]. Z tego powodu białka te nazywane są kwaśnymi białkami rybosomalnymi (ang. *acidic ribosomal proteins*) [99,100]. Kolejną cechą, odróżniającą białka P od pozostałych białek rybosomalnych jest fakt, że białka P1/P2 reprezentują klasę małych

białek, posiadających masę molekularną wynoszącą ok. 12 kDa [201,202]. Istotną cechą tych białek jest też to, że ulegają one posttranslacyjnej modyfikacji, tj. fosforylacji za pośrednictwem kinazy CK2, stąd też określa się je mianem białek „P” (ang. *phosphorylated*). Badania biochemiczne i strukturalne pozwoliły na opisanie ich budowy. W ich strukturze wyróżniono trzy charakterystyczne regiony: ustrukturalizowaną, globularną domenę N-terminalną (ang. *N-terminal domain*, NTD), domenę C-terminalną (ang. *C-terminal domain*, CTD) zawierającą odcinek wysoce konserwatywnych reszt aminokwasowych (SDDDMGFGLFD), identyczny w obrębie wszystkich eukariotycznych białek P, oraz fragment polipeptydowy łączący obie domeny i nadający całej strukturze dużą elastyczność strukturalną tzw. region zawiasowy [199,203,204]. W obrębie regionu C-terminalnego zlokalizowane są dwie ewolucyjnie konserwowane reszty seryny będące miejscami fosforylacji białek P przez kinazę białkową CK2 [205]. Rolą domen NTD jest formowanie heterodimerów P1-P2 oraz ich kotwiczenie na rybosomie za pośrednictwem białka uL10. Funkcjonalność domen CTD do dnia dzisiejszego nie jest w pełni scharakteryzowana. Wiadomo, że domena CTD bierze udział w bezpośrednich interakcjach z translacyjnymi GTPazami. Uważa się, że nieustrukturalizowane elementy CTD odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu translacyjnych GTPaz. Zdolność dostosowywania się białek P do oddziaływań z różnymi partnerami poprzez wykorzystanie indukowanego mechanizmu dopasowania w obrębie CTD, nadaje interakcji wysoką specyficzność. Ponadto, postuluje się, że obecność pięciu kopii domen CTD białek P (cztery pochodzące z białek P oraz jedna z białka uL10), odgrywa ważną rolę w tzw. „skanowaniu” otoczenia w zasięgu rybosomu wychwytyjąc czynniki translacyjne, celem podwyższenia funkcjonalności maszyny translacyjnej [77,204,206,207]. Ponadto, obecność pięciu kopii CTD odgrywa ważną rolę w zwiększeniu efektywności interakcji białek P z translacyjnymi GTPazami, a przede wszystkim z eEF1A, co uważane jest za allosteryczne wsparcie procesu dekodowania informacji za pośrednictwem centrum GAC [127]. Białka P są więc istotnymi elementami zapewniającymi pełną funkcjonalność dla rybosomu, która to uzależniona jest od sprawnego współdziałania z translacyjnymi GTPazami. Co ciekawe, szereg badań pokazał, że białka P są również miejscem interakcji toksyn z rodziny białek RIP. Jednym z przedstawicieli tej grupy białek jest rycyna. Wykazano, że katalityczna podjednostka rycyny (ang. *catalytic ricin A subunit*, RTA) wiąże się specyficznie z białkami P, a konsekwencją tego oddziaływania jest depurynacja pętli sarcynowo-rycynowej (ang. *sarcin-ricin loop*, SRL), drugiego istotnego elementu GAC, który jest kluczowym elementem w bezpośredniej stymulacji translacyjnych GTPaz do hydrolizy GTP. Szereg badań *in vivo* w zakresie

biologii komórki wykazał, że białka P stanowią kluczowy element specyficznie wiążący RTA na rybosomie eukariotycznym (rybosom bakteryjny, nie posiadający białek P, jest niewrażliwy na RTA). Przede wszystkim, wskazano, że strukturą która odgrywa rolę w interakcji z RTA, jest konserwatywna domena CTD białek P. Należy podkreślić, że mimo dobrze udokumentowanego udziału białek P w oddziaływaniach z białkami RIP, dotychczasowe badania biochemiczne, przeprowadzone w celu zidentyfikowania elementu bezpośrednio odpowiedzialnego za interakcje białek P z RTA czy innymi białkami RIP, przeprowadzono wyłącznie na izolowanych układach doświadczalnych, wykorzystując przede wszystkim krótkie peptydy czy fragmenty kompleksu białek P. W biochemicznych badaniach *in vitro* wykorzystano różne formy poszczególnych białek P, takie jak homodimery P2 [208], oligomery P1 lub uL10 [209] czy też syntetyczne peptydy [174,176,208,210,211]. Jako model eksperymentalny wykorzystano toksynę trichosantynę (ang. *trichsantin*, TCS) i zidentyfikowano miejsce interakcji białek P z toksynami RIP, wskazując obszar obejmujący 11-aminokwasowy peptyd SDDDMGFGLFD (P11), występujący w obrębie CTD wszystkich białek P [208]. Na podstawie badań struktury atomowej RTA z 6-aminokwasowym peptydem, odpowiadającym ostatnim sześciu konserwatywnym resztom domeny CTD białek P (GFGLFD) ustalono, że peptyd ten wiąże się do hydrofobowej kieszeni w obrębie RTA [176,211]. Z kolei analiza strukturalna kompleksów TCS-P2 i RTA-P2 wykazała, że peptyd P2 może przyjmować różne orientacje przestrzenne, czego efektem jest odmienny sposób interakcji z dwoma różnymi białkami RIP, sugerując tym samym elastyczność domeny CTD w aspekcie strukturalnym, czego rezultatem jest heterogenność strukturalna w oddziaływaniu z białkami RIP [176,211]. Oddziaływanie białek P z toksynami takimi jak RTA czy TCS, to kluczowy aspekt ich toksyczności, ponieważ interakcja ta kieruje białko RIP do rybosomu eukariotycznego, prowadząc do depurynacji pętli SRL, a co za tym idzie, blokuje działanie GAC i jednocześnie całą maszynę translacyjną. Dlatego też precyzyjne ustalenie mechanizmu oddziaływania domen CTD białek P z białkami RIP przyczyni się do lepszego opisanie ich toksyczności.

W niniejszej rozprawie podjęto się zadania analizy oddziaływań RTA wykorzystując kompleks dimerów ludzkich białek P1-P2, w celu zdefiniowania roli poszczególnych domen CTD ludzkich białek P1 i P2 w kontekście wiązania RTA. Do analizy wykorzystano rekombinacyjne białko RTA oraz opracowany nowatorski układ eksperymentalny na bazie tzw. delecyjnych form poszczególnych białek P1 i P2. W ramach powyższych badań,

opracowano konstrukty genetyczne pozwalające na heterologiczną ekspresję wspomnianych powyżej form białek P, w których usunięto 16-cie końcowych aminokwasów domeny CTD (nazywane dalej odpowiednio: P1<sub>ΔC</sub> - dla delecyjnej formy białka P1 oraz P2<sub>ΔC</sub> - dla delecyjnej formy białka P2). W zakres prowadzonych prac badawczych weszły działania w obrębie inżynierii białka, począwszy od manipulacji genetycznych, heterologicznej ekspresji otrzymanych konstruktów genetycznych, poprzez otrzymanie białek rekombinowanych, formowanie heterodimerów i potwierdzenie ich natywnego charakteru w podejściu biofizycznym. Jako element końcowy, zaimplementowano metody analiz oddziaływań białko-białko, w celu ustalenia znaczenia roli poszczególnych białek P jak i ich domen C-terminalnych w interakcji z RTA.

Dotychczas podjęte próby badawcze wskazały, że oddziaływania RIP z białkami P są bardzo specyficzne, ale analizy te wykonano z wykorzystaniem układów, które nie stanowią odzwierciedlenia biologicznego. Natywne białka P w formie indywidualnej są trudne do uzyskania z uwagi na ich parametry biologiczne, a co za tym idzie, ekspresja pojedynczych białek prowadzi do błędnego fałdowania białka P1 czy P2 i formowania oligomerów w roztworze. Mając na uwadze parametry biologiczne przy otrzymywaniu białek P oraz ich kompleksów, pierwszym etapem badań było zastosowanie odpowiedniego systemu ekspresyjnego zapewniającego wysoki poziom ekspresji, tak aby otrzymać satysfakcjonujące ilości białek rekombinacyjnych. Rekombinacyjne białka P1 i P2 zostały przygotowane w oparciu o procedurę ustaloną dla drożdżowych jak i ludzkich rybosomalnych białek P [212]. Wykorzystując potencjał naukowo-badawczy macierzystej jednostki naukowej i metody inżynierii genetycznej, zastosowano konstrukty genetyczne pozwalające na heterologiczną ekspresję pełnych ludzkich rybosomalnych białek P1 i P2 oraz przygotowano nowe konstrukty pozwalające na heterologiczną ekspresję tzw. białek delecyjnych, pozbawionych C-terminalnego elementu [181]. Punktem wyjściowym, mającym znaczenie dla całości prowadzonych badań było zastosowanie efektywnego wektora ekspresyjnego do wydajnej ekspresji białek rekombinowanych. Opierając się na wcześniejszych wynikach badań, które skupione były przede wszystkim na drożdżowych białkach P oraz ludzkich P1 i P2, do otrzymania konstruktów genetycznych zawierających geny kodujące ludzkie białka P, czy to w formie pełnej czy delecyjnej, wykorzystano wektor ekspresyjny pT7-7 pod kontrolą efektywnego promotora T7. W obrębie tego wektora znajduje się dodatkowa sekwencja liderowa zawierająca pięć aminokwasów pochodzących z N-terminalnej części białka  $\phi$ 10 bakteriofaga T7, która to zapewnia efektywną inicjację

translacji. Obecność tej sekwencji miała na celu zagwarantowanie wydajnej ekspresji ludzkich białek w układzie prokariotycznym [212–214]. Przygotowane konstrukty genetyczne posłużyły do przeprowadzenia heterologicznej ekspresji białek P1 i P2 oraz ich form delecyjnych. Początkowo, stosując metodykę ustaloną do preparatyki pełnych białek P, oczyszczono ludzkie białko P1 i P2. W skrócie, białko P1 pozyskano z tzw. frakcji nierozpuszczalnej otrzymanej z komórek *E. coli*, zaś białko P2, które lokalizowało się w tzw. rozpuszczalnej frakcji białkowej, zostało oczyszczone z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej. Analizy wykazały, że białka P1/P2 pomimo ich podobieństw w strukturze pierwszorzędowej charakteryzują się odmiennymi właściwościami biofizycznymi w roztworze, co było zauważalne już na etapie ich syntezy w komórkach *E. coli* i oczyszczania. Jak pokazały analizy SEC, ludzkie białko P1, podobnie jak jego odpowiednik drożdżowy, ma tendencję do formowania kompleksów oligomerycznych w postaci wysokocząsteczkowych agregatów, które są niestabilne strukturalnie i w konsekwencji następuje ich wytracenie z roztworu. Z kolei białko P2 było zdolne do formowania homodimeru, który jest stabilny w stosowanym buforze [215]. Krzywe chromatograficzne uzyskane podczas analiz SEC dla homodimeru P2-P2 miały symetryczny kształt w formie pojedynczego piku, wskazujący, że homodimer P2-P2 w roztworze miał charakter monodispersyjny, co świadczy o tym, że występuje tylko jedna forma tego białka w roztworze. Jak wykazano wcześniej stosując analizy biofizyczne, takie jak pomiary CD czy analizy z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej, drożdżowe oraz ludzkie białko P1 nie posiada dobrze uformowanej struktury, wykazując tzw. niski poziom złożoności strukturalnej, zwanej „molten globule” [192,215]. Z kolei analizy CD homodimeru P2 w warunkach denaturujących wykazały, że denaturacja białka przebiega zgodnie z modelem kooperatywnym, tj. białko to posiada dwa stany – ustrukturalizowany jak i zdenaturowany, co potwierdziło, że białko P2 może istnieć w roztworze jako stabilny kompleks homodimeryczny. Rozpatrując ludzkie białka P1 i P2 oraz ich parametry biofizyczne otrzymane na bazie analizy SEC, można stwierdzić, że zachowują się one jak wcześniej charakteryzowane białka P w formie izolowanej. Jednakże należy podkreślić fakt, że białko P2 występuje w tylko formie homodimerycznej, w przeciwieństwie do drożdżowego P2B, które jest niezdolne do formowania stabilnej formy dimerycznej, wykazując jednocześnie cechy monomeru, dimeru i kompleksów o wyższych masach molekularnych. Z kolei białko P1, podobnie jak pozostałe białka z grupy P1 formuje niestabilne strukturalnie oligomery. Wyniki te wskazują, że białka P1 i P2 występując niezależne, bez właściwego partnera, ulegają błędnemu fałdowaniu, co potwierdza

wcześniejsze obserwacje, że heterodimer P1-P2 jest prawdopodobnie jedyną optymalną formą biologiczną dla tych białek [216,217].

W ramach niniejszej pracy, wykorzystując opracowaną technologię, przeprowadzono heterologiczną ekspresję i oczyszczanie delecyjnych form białek P1 i P2. Co ważne, pomimo usunięcia końcowego fragmentu domeny CTD w białku P1<sub>ΔC</sub>, co wiązało się ze zmianą punktu izoelektrycznego z 4,21 na 4,94, z sukcesem zaimplementowano procedurę oczyszczania ustaloną dla natywnego białka P1. Zasadniczym elementem tej procedury było wykorzystanie do oczyszczania tzw. frakcji białek nierozpuszczalnych. Wybór tej frakcji był możliwy, ponieważ białko P1<sub>ΔC</sub>, podobnie jak pełne białko P1, występowało w puli białek, które w trakcie procedury oczyszczania są niestabilne strukturalnie i występują we frakcji tzw. ciałek inkluzyjnych (ang. *Inclusion Bodies*, IB) w fazie wodnej. Z uwagi na fakt, iż białko to lokalizuje się we frakcji nierozpuszczalnej możliwe było zastosowanie efektywnej, jednoetapowej procedury oczyszczania. Protokół oczyszczania opierał się na ultradźwiękowej dezintegracji komórek bakteryjnych w warunkach denaturujących oraz serii wirowań przy wzrastającej sile odśrodkowej. Postępujące po sobie wirowania miały na celu usunięcie pozostałości po niezdezintegrowanych komórkach bakteryjnych oraz odseparowanie frakcji IB od frakcji białek rozpuszczalnych. Tak otrzymana frakcja IB była ponownie zawieszana w buforze dezintegracyjnym oraz traktowana ultradźwiękami w celu wyekstrahowania białek nierozpuszczalnych w roztworze. Białko P2<sub>ΔC</sub>, pomimo braku fragmentu C-terminalnego, także zachowało parametry pełnego białka P2. W procedurze oczyszczania wykorzystana została frakcja rozpuszczalnych białek tzw. frakcja S100, uzyskana w wyniku wirowania różnicowego. Frakcję tę poddano ekstrakcji etanolowej, co jest unikalnym krokiem oczyszczania, w którym wykorzystano brak wrażliwości kwaśnych białek na wysokie stężenie etanolu. Delecyjne białko P2, pomimo usunięcia fragmentu C-terminalnego, które to wiązało się ze wzrostem punktu izoelektrycznego z 4,38 na 5,35, zachowało kwaśny charakter, a tym samym było niewrażliwe na wysokie stężenie etanolu i pozostało rozpuszczalne w 50% roztworze etanolu, w przeciwieństwie do dużej ilości pozostałych białek bakteryjnych, które uległy precypitacji w takich warunkach eksperymentalnych. W kolejnym kroku, otrzymany preparat białkowy oczyszczono wykorzystując do tego celu metodę chromatografii jonowymiennej, ponownie opierając się na niskiej wartości pI tego białka. Wartość ta, oscylującą w zakresie niskiego pH, przy zastosowaniu środowiska buforującego o pH 7,5, pozwoliła na zastosowanie kolumny chromatograficznej

zawierającej anionit, efektywnie wiążący białko P2<sub>ΔC</sub>. W konsekwencji, implementując procedury dla białek P1 i P2, otrzymano nie tylko pełne formy tych białek, ale także, wykorzystując nowe konstrukty genetyczne, ich formy delecyjne. Parametry biochemiczne wykazały, że białka delecyjne wykazują podobne cechy jak ich niezmienione odpowiedniki P1 i P2. W dalszych krokach, zasadniczym celem prac było otrzymanie delecyjnych dimerów białek P1-P2, które zawierają białka pozbawione C-terminalnego elementu. Formowanie poszczególnych kompleksów białkowych oparto na wcześniejszych wynikach opracowanych w Katedrze Biologii Molekularnej, które pokazały że natywną formą strukturalną dla białek P1/P2 jest heterodimer [195,212]. W celu otrzymania heterodimeru P1-P2 wykorzystano procedurę denaturacji/renaturacji mieszaniny białek P1 i P2, którą wdrożono w macierzystej jednostce w celu efektywnego formowania dimerów białek P1-P2 [215,218]. W warunkach natywnych białko P1 formuje oligomery niedostępne dla białka P2, które z kolei będąc w formie dimerycznej także jest niereaktywne w stosunku do białka P1. W konsekwencji, zastosowano denaturację chemiczną obu białek P, a następnie renaturację mieszaniny białek P1/P2, czego rezultatem było otrzymanie, formującego się spontanicznie po usunięciu czynnika denaturującego, heterodimeru. W ramach powyższej procedury zastosowano trzykrotny nadmiar jednego z partnerów białkowych, w tym przypadku białka P1. Miało to istotne znaczenie dla zapewnienia wysycenia białka P2 w procesie formowania się dimeru, tak aby jedyną formą uzyskaną na tym etapie był heterodimer P1-P2. Zastosowane podejście wynikało z faktu, że białko P1 bez naturalnego partnera jakim jest białko P2, oligomeryzuje i formuje agregaty o wysokiej masie molekularnej, które zostały usunięte z wykorzystaniem sita molekularnego. Analogicznie, powtórzono procedurę przy formowaniu pozostałych kompleksów heterodimerycznych, tj. P1<sub>ΔC</sub>-P2, P1-P2<sub>ΔC</sub> i P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>. W przypadku homodimerów P2-P2 oraz P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub>, wykorzystano fakt, iż kompleksy te spontanicznie formują struktury homodimeryczne w roztworze.

W kolejnym etapie otrzymane kompleksy białkowe poddano analizom biofizycznym wykorzystując metody takie jak SEC, CD, nanoDSF oraz „native”-MS. Miało to na celu opisanie parametrów biofizycznych kompleksów z jednoczesną weryfikacją poprawności strukturalnej otrzymanych dimerów, a co za tym idzie wskazania ich funkcjonalności, zwłaszcza kompleksów delecyjnych. Analizy SEC kompleksu P1-P2 wykazały, że występuje on głównie w formie frakcji o cechach monodispersyjnych, co świadczy, że kompleks ten funkcjonuje jako dimer, bez widocznych innych elementów oligomerycznych,



potwierdzając wcześniej wykonane analizy biofizyczne tego heterodimeru [187]. Chromatogramy SEC pozostałych kompleksów również charakteryzowały się obecnością pojedynczego piku, świadczącego o ich monodispersyjnym charakterze, z obecnością tylko jednej formy oligomerycznej w formie dimeru. Analiza ta wskazała na zachowanie natywnej struktury otrzymanych kompleksów, nawet pomimo usunięcia fragmentów domeny CTD. Parametry biofizyczne, wstępnie określone metodą SEC, zostały dodatkowo zweryfikowane badaniami struktury drugorzędowej z wykorzystaniem dichroizmu kołowego. Analiza CD wykazała, że poszczególne formy dimerów białek P wykazują charakterystyczne dla białek  $\alpha$ -helikalnych spektrum CD, w których to budowie obecność  $\alpha$ -helis stanowi około 50% struktury. Analizy CD heterodimeru P1-P2 pokazały, że jest on zbudowany wyłącznie ze struktur  $\alpha$ -helikalnych [187,215]. W przypadku dimeru P2 zanotowano widmo CD zawierające wyodrębnione dwa wyraźne minima, przy 208 nm i 222 nm, wskazujące na dominację  $\alpha$ -helikalnych elementów strukturalnych, co także znajduje potwierdzenie w analizach struktury homodimeru P2-P2 [187,215]. Analiza CD wykazała, że otrzymane kompleksy, czy to pełnego heterodimeru czy form delecyjnych, posiadają właściwą strukturę, co predysponuje je do analiz funkcjonalnych. Dodatkowo, aby potwierdzić poprawność strukturalną kompleksów przeprowadzono analizę ich stabilności termicznej wykorzystując do tego celu technikę nanoDSF, która pozwala na monitorowanie zmian w obrębie struktury trzeciorzędowej, opierającą się na zjawisku fluorescencji tryptofanu. Zastosowanie techniki nanoDSF było możliwe, ponieważ białko P1, w pozycji 43, posiada jedną resztę tryptofanu, co pozwoliło na śledzenie zmian konformacyjnych w obrębie tego aminokwasu we wzrastającym gradiencie temperatur. W efekcie zaobserwowano, że heterodimer P1-P2 wykazywał charakterystyczny, tzw. kooperatywny wzór denaturacji, z dwoma stadiami - dla formy poprawnie sfałdowanej oraz dla formy zdenaturowanej, z wyraźnym, pojedynczym miejscem przejścia między tymi dwoma stanami. Analogicznie wykonano pomiary zmiany wewnętrznej fluorescencji dla pozostałych badanych kompleksów. Zarówno pełne jak i delecyjne formy prezentowały podobny przebieg krzywych denaturacyjnych, wpisujących się w dwustopniowy model denaturacji, a tym samym wskazując na wysokie podobieństwo strukturalne między poszczególnymi kompleksami białek P. Wyniki analiz nanoDSF korespondują z danymi uzyskanymi w ramach analiz CD potwierdzając, że pozyskane kompleksy białek P, mimo usunięcia C-terminalnych fragmentów, posiadają prawidłową strukturę. Końcowym etapem weryfikacji parametrów biofizycznych kompleksów była analiza metodą spektrometrii mas w warunkach niedenaturujących. Należy wspomnieć, że spektrometria mas to technika,

która pozwala na określenie masy molekularnej różnorodnych molekuł z dokładnością do wartości pojedynczych Daltonów, co pozwala na nad wyraz precyzyjną ocenę masy molekularnej badanych molekuł. Niestety, analiza MS przeprowadzana jest w fazie gazowej, co nie sprzyja utrzymywaniu się kompleksów białkowych, które są związane jedynie słabymi oddziaływaniami niekowalencyjnymi. Dlatego też do analiz zastosowano łagodne warunki jonizacji, które umożliwiły ocenę masy molekularnej niekowalencyjnie powiązanych kompleksów białkowych. Wykorzystując tzw. technikę ESI (ang. *electrospray ionization*) możliwe było uzyskanie widm MS i określenie mas molekularnych badanych kompleksów. Na podstawie otrzymanych widm zidentyfikowano dwa typy białek. Pierwszy to pojedyncze białka P1 i P2, które powstały w wyniku rozpadu dimerów, zaś drugi to pełne dimery, które zostały zachowane w fazie gazowej dzięki łagodnym warunkom jonizacji. Dzięki analizie MS określono precyzyjnie masę pojedynczych białek rekombinowanych, potwierdzając ich tzw. 'tożsamość' molekularną, tzn. ich masa określona metodą MS odpowiadała masie określonej teoretycznie na bazie sekwencji aminokwasowej. W obrębie otrzymanych widm MS zidentyfikowano także masy zarówno dla pełnych kompleksów białkowych P1-P2 jak i dla ich form delecyjnych, które korespondowały z masami teoretycznymi otrzymanymi na bazie sekwencji aminokwasowych. Co ciekawe, pewna frakcja białek P, czy to P1 czy P2, była pozbawiona pojedynczej reszty metioniny. Jest to powszechne zjawisko w komórkach bakteryjnych, jako że w znacznej części białek bakteryjnych, metionina na N-końcu białka jest usuwana na drodze posttranslacyjnej modyfikacji. Podsumowując, analiza MS jednoznacznie pozwoliła na identyfikację białek P1/P2 oraz ich form delecyjnych, z nad wyraz wysoką precyzją, tj. w skali pojedynczych Daltonów. Ponadto, zidentyfikowano masę kompleksów, również jednoznacznie potwierdzając ich tzw. „tożsamość” molekularną. Co więcej, analiza MS dodatkowo potwierdziła rezultaty uzyskane na etapie eksperymentów SEC, wskazując, że w obrębie otrzymanych kompleksów występuje tylko jeden typ kompleksu, tj. dimery, które zawierają określone formy białek P.

Jako partnera do badań interakcji z białkami P wykorzystano katalityczną podjednostkę rycyny - RTA. Konstrukcję genetyczną kodującą białko RTA, wykorzystaną do heterologicznej ekspresji, zawierał gen dla RTA w fuzji z sekwencją kodującą tzw. etykietą histydynową (10xHis), która znajdowała się na N-terminalnym końcu białka. Wykorzystując wysokie powinowactwo etykiety 10xHis do jonów niklu, do oczyszczania białka RTA zastosowano chromatografię powinowactwa. Oczyszczanie białka wykonane na

drodze jednoetapowego procesu chromatograficznego przebiegło bardzo sprawnie. W rezultacie otrzymano preparat RTA o wysokiej czystości. Analogicznie do analiz kompleksów białek P, także frakcja białkowa RTA została scharakteryzowana biofizycznie. Pierwsza analiza metodą SEC wykazała, że RTA to homogenna frakcja, cechująca się monodispersyjnością próbki, co świadczy, że oczyszczone białko występuje tylko w jednej, monomerycznej formie. Parametry strukturalne zweryfikowano także metodą CD, na podstawie której stwierdzono, że RTA zbudowana jest przede wszystkim ze struktur  $\beta$ . Otrzymane parametry mają potwierdzenie w analizie strukturalnej z wykorzystaniem techniki krystalograficznej, która pokazała, że dominującą strukturą RTA jest struktura  $\beta$  [196,197]. Spektrometria mas w warunkach natywnych potwierdziła, że RTA posiada masę molekularną  $31337,85 \pm 0,60$  Da, co jest zgodne z obliczoną teoretyczną masą molekularną na podstawie jej sekwencji aminokwasowej - 31412,4 Da. W przypadku białka RTA w trakcie analiz MS również zanotowano różnicę w masie zmierzonej z teoretyczną, wskazując na, podobnie jak w przypadku kompleksów białek P, możliwe usunięcie pierwszej metioniny z rekombinowanego białka RTA.

W celu zdefiniowania roli poszczególnych elementów CTD w obrębie ludzkich białek P1 i P2 przeanalizowano oddziaływanie otrzymanych kompleksów ludzkich białek P i ich form delecyjnych z białkiem RTA. Zasadniczym elementem analiz było określenie parametrów kinetycznych interakcji, co pozwoliło na zdefiniowanie ilościowe powinowactwa (wyrażane jako stała dysocjacji  $K_D$ ) między dwoma partnerami ulegającymi specyficznym oddziaływaniami. Podjęte prace badawcze związane były z faktem, że nie zdefiniowano precyzyjnie interakcji między dimerem białek P a przedstawicielami rodziny białek RIP. Doskonałym przykładem jest rycyna, a przede wszystkim katalityczna podjednostka tej toksyny czyli RTA, która jest bezpośrednim partnerem dla białek P. Należy podkreślić, że znaczenie białek P i ich elementu C-terminalnego w interakcji z toksynami RIP, a w szczególności rola poszczególnych elementów CTD tj. ich stopień równocności w stosunku do białek RIP nie zostało opisane. Wszystkie dotychczasowe analizy opierały się na badaniach przeprowadzonych na tzw. izolowanych układach, które nie były odzwierciedleniem biologicznie aktywnych układów. W analizach tych wykorzystano na przykład syntetyczne peptydy czy też formy białek P takie jak homodimery białka P2 czy nawet oligomery białka P1. W związku z tym obecna wiedza na temat interakcji rybosomalnych białek P z białkami RIP pochodzi w dużej mierze z badań opartych na zastosowaniu niewłaściwych układów analitycznych, które mogą generować błędny obraz

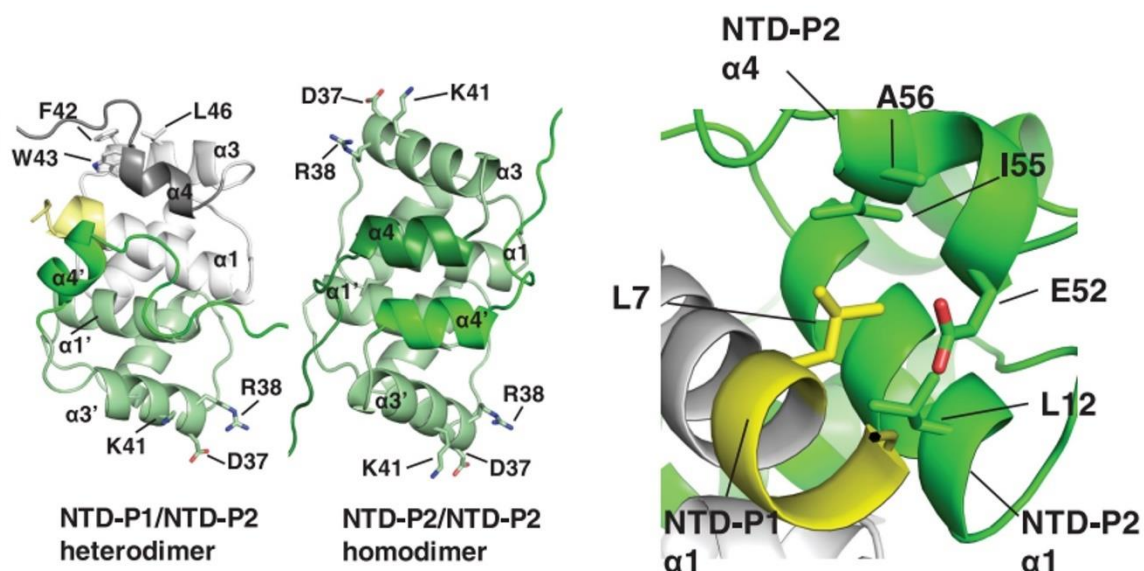
oddziaływań. W konsekwencji, w niniejszej pracy po raz pierwszy zbadano interakcję białka RIP (w formie RTA), wykorzystując tzw. najmniejszą funkcjonalną jednostkę strukturalną elementu „kciuka” rybosomalnego jaką jest heterodimer P1-P2 oraz dimery, w których usunięto poszczególne elementy CTD. Dysponując zweryfikowanymi pod względem strukturalno-biofizycznym kompleksami oraz białkiem RTA, możliwe było wykonanie analiz oddziaływań białko-białko. Do badań interakcji powyższych białek wykorzystano dwie komplementarne techniki: termoforezę mikroskalową - MST oraz interferometrię biowarstwową - BLI. Pierwsza metoda pozwala na ocenę powinowactwa dwóch partnerów, które oddziałują ze sobą, z jednoczesnym wyznaczeniem stałej dysocjacji  $K_D$ . Metoda ta należy do innowacyjnych technik z uwagi na fakt, że pozwala na pracę z materiałem biologicznym w skali pikomolowych ilości, zachowując przy tym wysoką czułość pomiarową, co znacząco ułatwia pracę z materiałem badawczym, który nie rzadko jest w bardzo limitowanej ilości. Zaletą tej metody jest także fakt, że analizy wykonuje się w roztworze, w którym partnerzy białkowi są w stanie wolnym (nie ulegają adsorpcji), a co za tym idzie analiza odzwierciedla warunki biologiczne panujące w komórce. W ramach tej analizy wykazano, że stała dysocjacji wynosi 86 nM, wskazując tym samym, że organizacja heterodimerska białek P posiada wysoki stopień powinowactwa do RTA. Z kolei skala nanomolarna świadczy o na nad wyraz wysokim stopniu specyficzności w zakresie interakcji badanych molekuł. Korzystając z tej samej konfiguracji eksperymentalnej wykonano analizy dla heterodimerów pozbawionych poszczególnych elementów CTD. Wykorzystując heterodimer P1-P2 $\Delta$ C otrzymana stała dysocjacji  $K_D$  wciąż oscylowała na poziomie nanomolarnym, choć ok. 6-krotnie wyższym, tj. 533 nM, w porównaniu do pełnego heterodimeru P1-P2, co wskazuje że pomimo usunięcia jednego fragmentu C-terminalnego z białka P2, kompleks heterodimeru jest w stanie efektywnie wiązać RTA. Natomiast w przypadku kompleksu z podwójną delecją domen CTD, tj. P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C zanotowano brak mierzalnego poziomu interakcji, co jednoznacznie świadczy o kluczowej roli CTD w oddziaływaniu z RTA. Biorąc pod uwagę znaczenie domen C-terminalnych w oddziaływaniach z RTA wynik ten potwierdza wcześniejsze badania, które wskazały C-terminalny region białek P jako element odpowiadający za interakcje z białkami RIP [208]. Najbardziej interesujące wyniki przyniosła analiza z wykorzystaniem kompleksu P1 $\Delta$ C-P2. Kompleks ten, pomimo posiadania jednej kopii fragmentu C-terminalnego (pochodzącego z pełnego białka P2) nie wykazywał zdolności do interakcji z RTA, czego wyrazem był brak możliwości wyznaczenia parametrów stałej dysocjacji. Wynik ten wskazuje na nierównocenne znaczenie elementów C-terminalnych poszczególnych białek

P1 i P2, ze wskazaniem, że domena CTD należąca do białka P1 jest kluczowym fragmentem kompleksu w interakcji z RTA. Porównując ze sobą wartości  $K_D$  dla dwóch heterodimerów delecyjnych, tj. P1-P2 $_{\Delta C}$ , w którym domenę CTD zachowało białko P1 oraz P1 $_{\Delta C}$ -P2, w którym białkiem z nienaruszoną domeną CTD było białko P2, ewidentnie zauważalna jest różnica w istotności poszczególnych domen CTD dla oddziaływań z RTA, na korzyść domeny C-terminalnej białka P1. Dodatkowo, rola białka P2 w wiązaniu RTA została przeanalizowana wykorzystując homodimer P2-P2, a otrzymana stała dysocjacji, która posiadała wartości w zakresie mikromolarnym, wskazała, że homodimer wykazuje niskie ale specyficzne powinowactwo do RTA sugerując, że białko P2 może także mieć pozytywny wpływ na wiązanie RTA. Wynik ten może świadczyć o tym, że dostęp do domeny CTD białka P2 może być ograniczony, pomimo że jego sekwencja aminokwasowa jest identyczna jak w białku P1. Rolę elementu CTD potwierdziła także analiza z użyciem dimeru P2 $_{\Delta C}$ -P2 $_{\Delta C}$ , który nie wykazywał potencjału do interakcji z RTA. Analizy oddziaływań z wykorzystaniem techniki MST zostały rozszerzone o dodatkową metodę, tj. technikę BLI, która jest nie tylko techniką komplementującą analizę MST, ale z racji na możliwości analizy w czasie rzeczywisty, pozwala określić kinetykę oddziaływań. Zgodnie z wynikami uzyskanymi metodą MST, analizy z użyciem techniki BLI potwierdziły najwyższe powinowactwo RTA wobec pełnego dimeru P1-P2, z  $K_D$  na poziomie nanomolarnym - 21 nM. Co ważne, analizy z wykorzystaniem form delecyjnych, jak kompleksu P1-P2 $_{\Delta C}$ , wskazały że kompleks taki posiada zbliżone powinowactwo jak pełna forma dimeru P1-P2, z  $K_D$  w zakresie nanomolarnym, o  $K_D$  rzędu 90 nM, podkreślając, że utrata jednego elementu CTD z białka P2 nie upośledza znacząco siły oddziaływań. W przeciwieństwie do kompleksu P1-P2 $_{\Delta C}$ , analiza z użyciem kompleksu P1 $_{\Delta C}$ -P2, czy nawet z kompleksami z podwójną delecją - P1 $_{\Delta C}$ -P2 $_{\Delta C}$  i P2 $_{\Delta C}$ -P2 $_{\Delta C}$ , nie wykazała potencjału do interakcji z RTA, co jednoznacznie wskazuje na wiodącą rolę białka P1 w oddziaływaniu z RTA. Podobnie jak w analizie MST, dimer P2-P2 wykazywał bardzo niskie, ale wykrywalne oddziaływanie w zakresie  $K_D$  ok. 2  $\mu$ M, co wskazuje, że dostępność strukturalna, a nie tylko sama sekwencja CTD warunkuje wysokie powinowactwo dimeru P1-P2 do białka RIP jakim jest RTA. Rozpatrując uzyskane w trakcie wykonanych analiz interakcji stałe dysocjacji dla ludzkiego heterodimeru P1-P2, należy podkreślić, że wartości te oscylowały w zakresie nanomolowym niezależnie od użytej metody. Wartości te były wielokrotnie mniejsze niż te uzyskane w badaniach wykorzystujących krótkie syntetyczne peptydy, a mianowicie, dane otrzymane z wykorzystaniem peptydów oscylowały na poziomie mikromolowym, z  $K_D=13 \mu$ M i  $K_D=3,4 \mu$ M (odpowiednio dla peptydów C9 i C11), co świadczy o dużo słabszym

oddziaływaniu peptydów z RTA. Rozbieżności te sugerują, że nie tylko sam element CTD jest miejscem wiązania RTA, ale obecność dodatkowych elementów w obrębie natywnej struktury heterodimerycznej może odgrywać pomocną rolę w oddziaływaniu [211]. Wynik ten potwierdza rezultat analiz oddziaływań RTA z delecyjnymi formami dimerów P1-P2, które pokazały, że dla wydajnej interakcji ważna jest obecność CTD białka P1, w przeciwieństwie do obecności identycznego elementu CTD w białku P2, który jest niewystarczającym elementem. Wyniki te wskazują na tzw. nierównocенność fragmentów C-terminalnych białek P1 i P2. Podsumowując, organizacja przestrzenna fragmentu CTD, a nie sama sekwencja, jest kluczem do wydajnej interakcji białek P z rodziną białek RIP.

Jednym z aspektów, który może mieć wpływ na zróżnicowaną zdolność wiązania domen CTD białek P1 i P2 do RTA są unikalne parametry strukturalne fragmentu C-terminalnego tych białek. Fragment ten jest klasyfikowany jako tzw. element o nieuporządkowanej strukturze, tj. nie posiadającym dobrze zdefiniowanej struktury przestrzennej (ang. *intrinsically disordered protein*). Jak wykazały aktualne badania w Katedrze Biologii Molekularnej, mające na celu określenie wpływu fosforylacji białek P na wiązanie białek RIP, wprowadzenie dodatkowego ujemnego ładunku w obrębie domeny C-terminalnej, zmienia specyfikę interakcji poprzez formowanie  $\alpha$ -helisy w obrębie CTD. Wynik ten wskazuje, że tzw. lokalne środowisko reszt aminokwasowych może mieć istotny wpływ na skalę wiązania białek RIP. Analizując sekwencję aminokwasową domeny CTD dla białka P1 (...**EEKKVEAKKEESEESDDDMGFGLFD**) oraz dla białka P2 (...**AEEKKDEKKEESEESDDDMGFGLFD**) można zauważyć, że końcowy fragment dla obu białek jest identyczny (zaznaczony pogrubioną czcionką), zaś wcześniejsze fragmenty (zaznaczone kursywą) w obu białkach posiadają odmienne reszty aminokwasowe, co może wpływać na przyjętą strukturę przestrzenną domen CTD dla poszczególnych białek i jednocześnie modulować siłę interakcji z RTA. Ponadto, analizy interakcji wykazały, że homodimer P2-P2, mający dwa podobne C-terminalne końce jak w kompleksie P1-P2, charakteryzuje się bardzo niskim powinowactwem do RTA, z  $K_D$  na poziomie mikromolarnym. Dodatkowo analiza BLI wykazała, że dimer ten charakteryzuje się też odmienną kinetyką interakcji z RTA, tj. otrzymane dane eksperymentalne interakcji homodimeru P2-P2 z RTA nie wpisywały się w klasyczny model oddziaływań 1:1, tak jak w przypadku heterodimeru P1-P2, co sugeruje odmienny, heterogenny mechanizm wiązania dimeru P2-P2 z RTA. Wyniki te potwierdzają przypuszczenia, że strukturalna organizacja w obrębie C-terminalnego elementu ma także istotne znaczenie dla interakcji z RTA.

Rozpatrując tak istotne różnice w powinowactwie między heterodimerem P1-P2 a homodimerem P2-P2 czy dimerami delecyjnymi z RTA, należy także podkreślić istotne różnice w zakresie struktury dimerów. Z jednej strony, analizy strukturalne o niskiej rozdzielczości, wykorzystujące technikę niskokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich SAXS [219] wykazały, że ludzki homodimer P2-P2 i heterodimer P1-P2 są do siebie strukturalnie podobne, tj. posiadają wydłużoną strukturę sięgającą ponad 13 nm. Z drugiej strony, dane strukturalne uzyskane techniką spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego - NMR wykazały, że topologia domen NTD-P1/NTD-P2 ludzkiego heterodimeru i domen NTD-P2 ludzkiego homodimeru są podobne, posiadają odmienną organizację strukturalną w obrębie domeny N-terminalnej (NTD), która jest elementem wiążącym dwa białka P1 i P2 (Ryc. 87) [114,219].



**Ryc. 87. Asymetryczna struktura domen NTD białek P1 i P2 w konformacji homo- i heterodimerycznej** [114]. Panel lewy – porównanie strukturalne NTD-P1/NTD-P2 heterodimeru i NTD-P2 homodimeru. Panel prawy – wskazanie dodatkowej pętli w obrębie helisy-1 ( $\alpha$ -1) domeny NTD białka P1 (zaznaczonej kolorem żółtym). Kolorem szarym oznaczono domenę NTD białka P1, kolorem zielonym - domenę NTD białka P2; symbolami  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -4 – poszczególne helisy domeny NTD białka P1;  $\alpha'$ -1,  $\alpha'$ -3,  $\alpha'$ -4 – poszczególne helisy domeny NTD białka P2. Literami z liczbami oznaczono hydrofobowe reszty aminokwasowe, odpowiednio: F42 - Phe-42, W43 - Trp43, L46 - Leu-46, K41 - Lys-41, D37 - Asp-37, L7 - Lue-7, L12 - Leu-12, E52 - Glu-52, I55 - Ile-55, A56 - Ala-56.

Każdy monomer domen NTD białka P1 (oznaczany dalej jako NTD-P1) lub NTD białka P2 (oznaczany dalej jako NTD-P2) składa się z czterech helis („ $\alpha$ ”), z  $\alpha$ -1 umieszczoną w hydrofobowym rdzeniu i  $\alpha$ -3 umiejscowioną poza płaszczyzną dimeryzacyjną. Natomiast

w przeciwieństwie do NTD-P2 homodimeru, struktura NTD-P1/NTD-P2 heterodimeru jest asymetryczna - poszczególne domeny NTD-P1 i NTD-P2 różnią się orientacją w obrębie helisy  $\alpha$ -4. W NTD-P2 homodimeru  $\alpha$ -4 umiejscowiona jest na  $\alpha$ -1 tego samego łańcucha, w przeciwieństwie do heterodimeru, w którym to  $\alpha$ -4 NTD-P2 znajduje się na  $\alpha$ -1 NTD-P1 (Ryc. 87, panel lewy). Jest to możliwe dzięki występowaniu w obrębie  $\alpha$ -1 NTD-P1 dodatkowej pętli, której obecność pozwala reszcie Leu-7 NTD-P1 na oddziaływanie hydrofobowe z resztami Glu-52, Ile-55 i Ala-56 NTD-P2 (Ryc. 87, panel prawy). Dodatkowa pętla  $\alpha$ -1 NTD-P1 tworzy rozległe oddziaływania międzycząsteczkowe z  $\alpha$ -1 i  $\alpha$ -4 NTD-P2. Ta obserwacja pokazuje, że  $\alpha$ -4 w NTD-P1 i NTD-P2 są zdolne do przyjmowania odmiennej konformacji w stosunku do homodimeru. Dlatego też struktura heterodimeru narzuca orientację strukturalną fragmentu CTD białka P1, promując jego interakcje z białkami RIP. W związku z powyższym, różnice w obserwowanych interakcjach, z wykorzystaniem zastosowanych kompleksów mogą być związane, z jednej strony z unikalnym środowiskiem reszt aminokwasowych, w którym obecność nawet jednej odmiennej reszty może predysponować interakcję CTD białka P1 z RTA oraz co najważniejsze, z odmienną organizacją strukturalną heterodimeru, która pozwala na wyeksponowanie fragmentu CTD i efektywne oddziaływanie białka P1 z toksyną.

Należy wspomnieć, że w zakresie projektu naukowego skierowanego na opisane mechanizmu interakcji białek P z białkami RIP w macierzystym laboratorium, wykonano analizy interakcji białek P w formie pentameru. Porównując otrzymane w zakresie niniejszej pracy dane z rezultatami analogicznych badań przeprowadzonych dla kompleksu pentamerycznego białek P izolowanych z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wykazano, że pentamer uL10(P1-P2)<sub>2</sub> charakteryzował się stałą dysocjacji również na poziomie nanomolarnym [220] [171]. Ponadto, w ramach prac badawczych skierowanych na zdefiniowanie mechanizmu oddziaływania białek RIP z białkami P przeanalizowano pentameryczny kompleks ludzkich białek P wraz z wariantami delecyjnymi w obrębie CTD. W efekcie, dla ludzkiego kompleksu pentamerycznego określono wartość  $K_D$  na poziomie 4 nM (w przypadku ludzkiego heterodimeru P1-P2 było to 20 nM). Wyższe powinowactwo pentameru w porównaniu z dimerem P1-P2 może być spowodowane tym, że w obrębie pentameru są dwa białka P1, a tym samym dodatkowa kopia elementu CTD w układzie pentamerycznym, co może zwiększać efektywność wiązania RTA do kompleksu. Uzyskane w ramach projektu zajmującego się analizą interakcji pentameru z RTA wyniki były zgodne z wynikami otrzymanymi w ramach niniejszej pracy dla delecyjnych dimerów białek P1-P2,



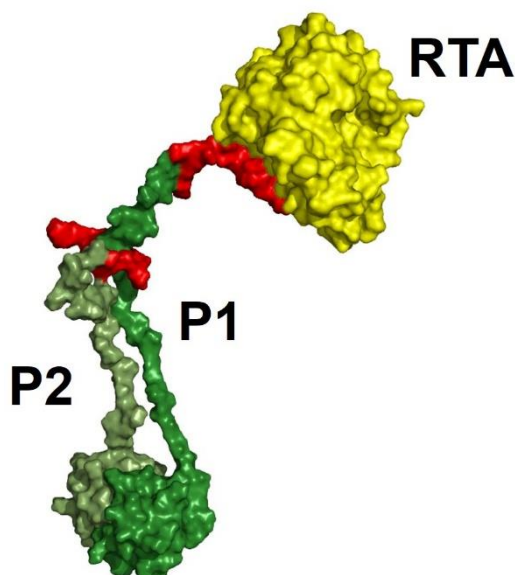
potwierdzając tym samym nierównocенność domen CTD białek P1 i P2 i jednocześnie wskazując na kluczową rolę białka P1 w interakcji z toksynami pochodzącymi z rodziny białek RIP.

## PODSUMOWANIE

Celem przedstawionych w niniejszej rozprawie prac badawczych było zdefiniowanie roli poszczególnych elementów CTD w obrębie ludzkich białek P1 i P2 w interakcji z przedstawicielem rodziny białek RIP - katalityczną podjednostką rycyny (RTA). Zasadniczym etapem badawczym było otrzymanie rekombinowanych, pełnych białek P1/P2, ich form delecyjnych P1 $\Delta$ C/P2 $\Delta$ C, (pozbawionych 16 reszt aminokwasowych na C-terminalnym końcu) oraz białka RTA. Zweryfikowane pod względem strukturalnym białka rekombinowane wykorzystano do uformowania poszczególnych kompleksów białkowych: natywnego heterodimeru P1-P2, heterodimerów delecyjnych - P1-P2 $\Delta$ C, P1 $\Delta$ C-P2, P1 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C oraz homodimerów P2-P2 i P2 $\Delta$ C-P2 $\Delta$ C. Uzyskane dimery białek P przeanalizowano z wykorzystaniem metod biofizycznych takich jak SEC, CD, nanoDSF czy „native”-MS, poddając ocenie ich parametry biofizyczne z jednoczesną oceną ich poprawności strukturalnej. W wyniku przeprowadzonych analiz zaobserwowano, że pomimo usunięcia fragmentu CTD w delecyjnych kompleksach białek P1 $\Delta$ C i P2 $\Delta$ C ich struktura nie uległa znaczącym zmianom. Analogicznie przeprowadzono charakterystykę biofizyczną białka RTA.

W celu zdefiniowania roli poszczególnych białek P jak i ich fragmentów CTD przeanalizowano oddziaływanie otrzymanych kompleksów ludzkich białek P i ich form delecyjnych z białkiem RTA implementując metody analiz interakcji białko:białko - MST oraz BLI. W rezultacie wskazano na kluczową rolę domen CTD w oddziaływaniu z RTA, jednoznacznie potwierdzając wcześniejsze badania, które wskazały C-terminalny region białek P jest odpowiedzialny za interakcje z białkami RIP [208]. Co więcej, po raz pierwszy wykazano dominującą rolę białka P1, a w szczególności jego domeny C-terminalnej, co wskazuje na nierównocenne znaczenie elementów CTD poszczególnych białek P1 i P2. Z kolei wyniki analiz kompleksów homodimerycznych mogą świadczyć o ograniczonej dostępności do domeny CTD białka P2 wynikającej z przyjmowania odmiennej konfiguracji przestrzennej homodimeru w porównaniu do heterodimeru P1-P2. Na bazie otrzymanych

wyników możliwe było zaproponowanie modelu interakcji heterodimeru P1-P2 z białkiem RTA (Ryc. 88). W proponowanym modelu uwzględniono organizację przestrzenną heterodimeru, która pozwala na wyeksponowanie fragmentu CTD białka P1, co promuje interakcję heterokompleksu z białkami RIP.



**Ryc. 88. Model organizacji przestrzennej ludzkiego heterodimeru P1-P2 w interakcji z katalityczną podjednostką rycyny - RTA.** Kolorem żółtym oznaczono katalityczną podjednostkę rycyny - RTA [PDB ID:1 RTC], kolorem czerwonym 16-cie reszt aminokwasowych w obrębie C-terminalnego elementu białek P, kolorem ciemnozielonym białko P1, zaś kolorem jasnozielonym - białko P2 [PDB ID:4BEH].

Wykonane prace badawcze wykazały, że heterodimeryczna konformacja P1-P2 w obrębie struktury „kciuka” rybosomalnego stanowi optymalne miejsce wiązania RTA oraz wskazano, że fragmenty CTD białek P1 i P2 mają nierównocenną rolę w interakcji z RTA, z białkiem P1 jako zasadniczym elementem wiążącym toksyny RIP.

## ABSTRACT

The eukaryotic ribosomal stalk is a protein complex within the ribosomal GTPase center that is responsible for stimulating GTP hydrolysis through translational GTPases, proteins that assist the ribosome in the translation process. The stalk complex is composed of the uL10 ribosomal protein and the unique for eukaryotes P1/P2 proteins. Two P1-P2 heterodimers together with the uL10 protein form a pentameric complex with the uL10(P1-P2)<sub>2</sub> configuration. The pentameric complex is responsible for the interaction with translational GTPases, playing a role in their binding to the ribosome and is involved in the stimulation of GTP hydrolysis mediated by translational GTPases. Consequently, the pentameric complex is responsible for the high translational processivity of the ribosome. The ribosomal proteins included in the pentameric complex contain a highly conserved C-terminal fragment that is critical for interaction with translational GTPases. The C-terminal fragment is believed to be the main binding platform for the family of translational GTPases, providing full functionality for the ribosome. Interestingly, a number of studies have shown that these proteins are also a target for the Ribosomal Inactivating Protein (RIP) family, which are considered to be one of the most toxic proteins in nature. RIP proteins lead to the depurination of rRNA within the GTPase center, which leads to inhibition of ribosome-mediated translation, resulting in cell death.

The aim of the research in this study was to prescribe the role of individual P proteins, and above all to define the role of individual C-terminal fragments in the interaction with the RIP protein - ricin. For this purpose, the interaction of human P-protein complexes and their deletion forms with the ricin catalytic subunit (RTA) was investigated. It should be emphasized that despite of many years of research, the interaction of RIP proteins with ribosomal P proteins has not been thoroughly investigated. The participation of P proteins and their C-terminals in the binding of RIP proteins was described using a series of biochemical tests, but the analyzes were carried out only in the so-called isolated experimental systems using various forms of oligomeric P proteins, such as P2 homodimers or P1 oligomers, or with the use of short peptides. Due to the fact that P proteins preferentially form biologically significant P1-P2 heterodimers, which are considered to be the central functional element of the ribosomal stalk, this study investigated the interaction of the P1-P2 dimer with RIP proteins, using the heterodimer as a so-called the smallest

functional structural unit of the stalk. As a part of the research work, *de novo* genetic constructs were developed to obtain the so-called deletion forms of human P proteins in which the 16 conserved C-terminal amino acids have been removed (respectively named P1<sub>ΔC</sub> for the P1 protein lacking the CTD fragment and P2<sub>ΔC</sub> for the P2 protein also lacking the C-terminal fragment). The scope of research included a number of activities in the field of molecular biology and biophysical analyzes, including genetic and protein engineering, Size Exclusion Chromatography (SEC), Circular Dichroism (CD), Nano differential scanning fluorimetry (nanoDSF) and Native Mass Spectrometry (MS). In addition, techniques to analyze protein-protein molecular interactions such as Microscale Thermophoresis (MST) and Bio-layer Interferometry (BLI) were used.

The first task was to obtain recombinant P1, P2 proteins and their deletion forms - P1<sub>ΔC</sub> and P2<sub>ΔC</sub>. For this purpose, heterologous expression and purification of P proteins was performed depending on the biophysical parameters of individual proteins. Obtained individual recombinant proteins were used to form protein complexes: P1-P2 heterodimer, heterodimeric deletion forms - P1-P2<sub>ΔC</sub>, P1<sub>ΔC</sub>-P2, P1<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> and P2-P2 and P2<sub>ΔC</sub>-P2<sub>ΔC</sub> homodimers. In the next step, the structural characterization of the obtained P protein complexes was carried out using biophysical methods such as SEC, CD, nanoDSF and "native"-MS. In parallel, heterologous expression of the ricin catalytic subunit (RTA) was performed. The obtained recombinant protein was purified by affinity chromatography. Analogous to the dimer analyzes the biophysical characterization of RTA was performed. The protein:protein interaction study was performed using two methods: MST and BLI. As a results of the research, the values of dissociation constants were determined from which the level of affinity of individual complexes to RTA could be specified. The obtained results indicated that the C-terminal region of P proteins is responsible for the interaction with RIP proteins. Moreover, these studies allowed to precisely define the role of individual C-terminal elements, indicating the unequal role of these polypeptide fragments within the P1 and P2 proteins - it was observed that the C-terminal fragment derived from the P1 protein plays a dominant role in the interactions with RTA. The results of the analyzes suggest that not only the C-terminal fragment, but also the spatial organization of the P1-P2 dimer is important for the interaction with RTA. On the basis of the obtained results, a model of interaction of the P1-P2 heterodimer was proposed, taking into account the spatial organization of the complex, indicating that the system of two P1-P2 proteins ensures the

proper spatial orientation of the C-terminal fragment of the P1 protein, which promotes interaction with RIP proteins.

Wyniki pracy doktorskiej są przedmiotem:

- publikacji

- Grela, P., Li, X.-P., Horbowicz, P., Dźwierzyńska, M., Tchórzewski, M., & Tumer, N. E. (2017). Human ribosomal P1-P2 heterodimer represents an optimal docking site for ricin A chain with a prominent role for P1 C-terminus. *Scientific Reports*, 7(1), 5608.

- konferencji naukowych (posterów)

- Grela, P., Dźwierzyńska, M., Li, X.-P., Tchórzewski, M., & Tumer, N. E Human stalk proteins P1 and P2 do not respond equally to deletion of their conserved C terminal peptide in interaction with ricin. EMBO Conference: Protein Synthesis and Translational Control. 6-9.09.2017 Heidelberg, Germany.
- Horbowicz-Drożdżal P., Borkiewicz L., Dźwierzyńska M., Szajwaj M., Molestak E., Deryło K., Filipek K., Michalec-Wawiórka B., Wawiórka L., Zhang Z., Shao Y., Tchórzewski M., Grela P. Interplay of ribosomal stalk P-proteins with ricin and trichosanthin, the plant ribosome-inactivating proteins. EMBO Protein Synthesis and Translational Control, 4-7.09.2019, Heidelberg, Niemcy

**Badania wykonywane w ramach niniejszej pracy doktorskiej były finansowane z grantów: Narodowego Centrum Nauki OPUS (UMO-2014/13/B/NZ1/00953), grantu National Institute of Health AI072425 oraz NIH TW008418 Fogarty International Center Collaboration Award (FIRCA).**

## DOROBEK NAUKOWY

### *Publikacje doświadczalne*

1. Grela, P., Li, X.-P., Horbowicz, P., Dźwierzyńska, M., Tchórzewski, M., & Tumer, N. E. (2017). Human ribosomal P1-P2 heterodimer represents an optimal docking site for ricin A chain with a prominent role for P1 C-terminus. *Scientific Reports*, 7(1), 5608.
2. Marczak M., Dźwierzyńska M., Skorupska A. (2013). Homo- and heterotypic interactions between Pss proteins involved in the exopolysaccharide transport system in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Biological Chemistry* 394(4): 541-559.
3. Kreft A. , Kazimierczak W. , Sierpińska A. , Skrzypek H. , Skrabucha A. , Dybała M. , Dźwierzyńska. 2012 M. *Progress in plant protection/Postępy w ochronie roślin*. 52 (4)

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. Ramakrishnan V. The Ribosome Emerges from a Black Box. *Cell*. 2014;159: 979–984. doi:10.1016/j.cell.2014.10.052
2. Nissen P. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science*. 2000;289: 920–930. doi:10.1126/science.289.5481.920
3. Ban N. The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science*. 2000;289: 905–920. doi:10.1126/science.289.5481.905
4. Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802), 327–339. <https://doi.org/10.1038/35030006>
5. Schmeing TM, Ramakrishnan V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 2009;461: 1234–1242. doi:10.1038/nature08403
6. Nikulin, A., Eliseikina, I., Tishchenko, S., Nevskaya, N., Davydova, N., Platonova, O., Nikonov, S. (2003). Structure of the L1 protuberance in the ribosome. *Nature Structural Biology*, 10(2), 104–108. <https://doi.org/10.1038/nsb886>
7. Ban N, Beckmann R, Cate JH, Dinman J, Dragon F, Ellis SR, et al. A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 2014. doi:10.1016/j.sbi.2014.01.002
8. Diaconu M, Kothe U, Schlünzen F, Fischer N, Harms JM, Tonevitsky AG, et al. Structural Basis for the Function of the Ribosomal L7/12 Stalk in Factor Binding and GTPase Activation. *Cell*. 2005;121: 991–1004. doi:10.1016/j.cell.2005.04.015
9. Myasnikov, A. G., Kundhavai Natchiar, S., Nebout, M., Hazemann, I., Imbert, V., Khatter, H., Klaholz, B. P. (2016). Structure-function insights reveal the human ribosome as a cancer target for antibiotics. *Nature Communications*, 7, 12856. <https://doi.org/10.1038/ncomms12856>
10. Khatter H, Myasnikov AG, Natchiar SK, Klaholz BP. Structure of the human 80S ribosome. *Nature*. 2015;520: 640–645. doi:10.1038/nature14427
11. Gilles A, Frechin L, Natchiar K, Biondani G, Loeffelholz O von, Holvec S, et al. Targeting the Human 80S Ribosome in Cancer: From Structure to Function and Drug Design for Innovative Adjuvant Therapeutic Strategies. *Cells*. 2020;9. doi:10.3390/cells9030629
12. Wilson DN, Doudna Cate JH. The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4: a011536–a011536. doi:10.1101/cshperspect.a011536



13. Arisue, N., Maki, Y., Yoshida, H., Wada, A., Sanchez, LidyaB., Moller, M., & Hashimoto, T. (2004). Comparative Analysis of the Ribosomal Components of the Hydrogenosome-Containing Protist, *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Molecular Evolution*, 59(1). <https://doi.org/10.1007/s00239-004-2604-0>
14. Liljas A, Ehrenberg M. Structural aspects of protein synthesis. 2nd edition. New Jersey: World Scientific; 2013.
15. Tomal A, Kwasniak-Owczarek M, Janska H. An Update on Mitochondrial Ribosome Biology: The Plant Mitoribosome in the Spotlight. *Cells*. 2019;8. doi:10.3390/cells8121562
16. Ogle JM, Carter AP, Ramakrishnan V. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci*. 2003;28: 259–266. doi:10.1016/S0968-0004(03)00066-5
17. Jenner L, Demeshkina N, Yusupova G, Yusupov M. Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17: 1072–1078. doi:10.1038/nsmb.1880
18. Yamamoto H, Qin Y, Achenbach J, Li C, Kijek J, Spahn CMT, et al. EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12: 89–100. doi:10.1038/nrmicro3176
19. Trabuco LG, Schreiner E, Eargle J, Cornish P, Ha T, Luthey-Schulten Z, et al. The role of L1 stalk:tRNA interaction in the ribosome elongation cycle. *J Mol Biol*. 2010;402: 741–760. doi:10.1016/j.jmb.2010.07.056
20. Fei J, Kosuri P, MacDougall DD, Gonzalez RL. Coupling of ribosomal L1 stalk and tRNA dynamics during translation elongation. *Mol Cell*. 2008;30: 348–359. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.012
21. Kothe U, Wieden H-J, Mohr D, Rodnina MV. Interaction of helix D of elongation factor Tu with helices 4 and 5 of protein L7/12 on the ribosome. *J Mol Biol*. 2004;336: 1011–1021. doi:10.1016/j.jmb.2003.12.080
22. Mv R, H S, A S, Hj W, D M, Nb M, et al. GTPases mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. In: *Biological chemistry* [Internet]. *Biol Chem*; Jun 2000 [cited 14 Aug 2020]. doi:10.1515/BC.2000.050
23. Harms J, Schluenzen F, Zarivach R, Bashan A, Gat S, Agmon I, et al. High Resolution Structure of the Large Ribosomal Subunit from a Mesophilic Eubacterium. *Cell*. 2001;107: 679–688. doi:10.1016/S0092-8674(01)00546-3
24. Ramakrishnan V. Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell*. 2002;108: 557–572. doi:10.1016/S0092-8674(02)00619-0
25. Wintermeyer W, Rodnina MV. Ribosomal Protein Synthesis. In: Steinbüchel A, editor. *Biopolymers Online*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005. p. bpol7001. doi:10.1002/3527600035.bpol7001

26. Brodersen DE, Clemons WM, Carter AP, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Crystal structure of the 30 s ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 s RNA. *J Mol Biol.* 2002;316: 725–768. doi:10.1006/jmbi.2001.5359
27. Agrawal RK, Penczek P, Grassucci RA, Frank J. Visualization of elongation factor G on the *Escherichia coli* 70S ribosome: The mechanism of translocation. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95: 6134–6138. doi:10.1073/pnas.95.11.6134
28. Noller HF. Ribosomal RNA and translation. *Annu Rev Biochem.* 1991;60: 191–227. doi:10.1146/annurev.bi.60.070191.001203
29. Voorhees RM, Weixlbaumer A, Loakes D, Kelley AC, Ramakrishnan V. Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16: 528–533. doi:10.1038/nsmb.1577
30. Schmeing TM, Huang KS, Strobel SA, Steitz TA. An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA. *Nature.* 2005;438: 520–524. doi:10.1038/nature04152
31. Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, et al. Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. *Science.* 2005;310: 827–834. doi:10.1126/science.1117230
32. Yusupov MM. Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science.* 2001;292: 883–896. doi:10.1126/science.1060089
33. Diaconu M, Kothe U, Schlünzen F, Fischer N, Harms JM, Tonevitsky AG, et al. Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell.* 2005;121: 991–1004. doi:10.1016/j.cell.2005.04.015
34. Davydov II, Wohlgemuth I, Artamonova II, Urlaub H, Tonevitsky AG, Rodnina MV. Evolution of the protein stoichiometry in the L12 stalk of bacterial and organellar ribosomes. *Nat Commun.* 2013;4: 1387. doi:10.1038/ncomms2373
35. Cundliffe E. Involvement of Specific Portions of Ribosomal RNA in Defined Ribosomal Functions: A Study Utilizing Antibiotics. In: Hardesty B, Kramer G, editors. *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes.* New York, NY: Springer; 1986. pp. 586–604. doi:10.1007/978-1-4612-4884-2\_34
36. Egebjerg J, Douthwaite SR, Liljas A, Garrett RA. Characterization of the binding sites of protein L11 and the L10.(L12)<sub>4</sub> pentameric complex in the GTPase domain of 23 S ribosomal RNA from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1990;213: 275–288. doi:10.1016/S0022-2836(05)80190-1
37. Hausner TP, Atmadja J, Nierhaus KH. Evidence that the G2661 region of 23S rRNA is located at the ribosomal binding sites of both elongation factors. *Biochimie.* 1987;69: 911–923. doi:10.1016/0300-9084(87)90225-2
38. Schindler DG, Davies JE. Specific cleavage of ribosomal RNA caused by alpha sarcin. *Nucleic Acids Res.* 1977;4: 1097–1110. doi:10.1093/nar/4.4.1097

39. Endo Y, Wool IG. The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J Biol Chem.* 1982;257: 9054–9060.
40. Hwu L, Huang K, Chen D, Lin A. The action mode of the ribosome-inactivating protein alpha-sarcin. *J Biomed Sci.* 2000;7: 420–428. doi:10.1007/BF02255817
41. Endo Y, Tsurugi K. The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. *J Biol Chem.* 1988;263: 8735–8739.
42. Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem.* 1987;262: 5908–5912.
43. As P, Cr B, E H, Y X, Cc W, C H, et al. Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2013;41: 7522–7535. doi:10.1093/nar/gkt513
44. Correll CC, Beneken J, Plantinga MJ, Lubbers M, Chan Y-L. The common and the distinctive features of the bulged-G motif based on a 1.04 Å resolution RNA structure. *Nucleic Acids Res.* 2003;31: 6806–6818. doi:10.1093/nar/gkg908
45. Havrila M, Réblová K, Zirbel CL, Leontis NB, Šponer J. Isosteric and nonisosteric base pairs in RNA motifs: molecular dynamics and bioinformatics study of the sarcin-ricin internal loop. *J Phys Chem B.* 2013;117: 14302–14319. doi:10.1021/jp408530w
46. Heus HA, Pardi A. Structural features that give rise to the unusual stability of RNA hairpins containing GNRA loops. *Science.* 1991;253: 191–194. doi:10.1126/science.1712983
47. Szewczak AA, Moore PB, Chang YL, Wool IG. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90: 9581–9585.
48. Seggerson K, Moore PB. Structure and stability of variants of the sarcin-ricin loop of 28S rRNA: NMR studies of the prokaryotic SRL and a functional mutant. *RNA.* 1998;4: 1203–1215.
49. Scalfani VF, Williams AJ, Tkachenko V, Karapetyan K, Pshenichnov A, Hanson RM, et al. Programmatic conversion of crystal structures into 3D printable files using Jmol. *J Cheminformatics.* 2016;8. doi:10.1186/s13321-016-0181-z
50. Maracci C, Peske F, Dannies E, Pohl C, Rodnina MV. Ribosome-induced tuning of GTP hydrolysis by a translational GTPase. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111: 14418–14423. doi:10.1073/pnas.1412676111
51. García-Ortega L, Alvarez-García E, Gavilanes J, Martínez-del-Pozo A, Joseph S. Cleavage of the sarcin-ricin loop of 23S rRNA differentially affects EF-G and EF-Tu binding. *Nucleic Acids Res.* 2010;38: 4108–19. doi:10.1093/nar/gkq151

52. Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001;294: 1299–1304. doi:10.1126/science.1062023
53. Gao Y-G, Selmer M, Dunham CM, Weixlbaumer A, Kelley AC, Ramakrishnan V. The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the post-translocational state. *Science*. 2009;326: 694–699. doi:10.1126/science.1179709
54. Voorhees RM, Schmeing TM, Kelley AC, Ramakrishnan V. The Mechanism for Activation of GTP Hydrolysis on the Ribosome. *Science*. 2010;330: 835–838. doi:10.1126/science.1194460
55. Beringer M, Rodnina MV. The Ribosomal Peptidyl Transferase. *Mol Cell*. 2007;26: 311–321. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.015
56. Maracci C, Rodnina MV. Review: Translational GTPases. *Biopolymers*. 2016;105: 463–475. doi:10.1002/bip.22832
57. Murray J, Savva CG, Shin B-S, Dever TE, Ramakrishnan V, Fernández IS. Structural characterization of ribosome recruitment and translocation by type IV IRES. Subramaniam S, editor. *eLife*. 2016;5: e13567. doi:10.7554/eLife.13567
58. Daviter T, Wieden H-J, Rodnina MV. Essential Role of Histidine 84 in Elongation Factor Tu for the Chemical Step of GTP Hydrolysis on the Ribosome. *J Mol Biol*. 2003;332: 689–699. doi:10.1016/S0022-2836(03)00947-1
59. Cunha CE, Belardinelli R, Peske F, Holtkamp W, Wintermeyer W, Rodnina MV. Dual use of GTP hydrolysis by elongation factor G on the ribosome. *Translation*. 2013;1: e24315. doi:10.4161/trla.24315
60. Adamczyk AJ, Warshel A. Converting structural information into an allosteric-energy-based picture for elongation factor Tu activation by the ribosome. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108: 9827–9832. doi:10.1073/pnas.1105714108
61. Fischer N, Neumann P, Bock LV, Maracci C, Wang Z, Paleskava A, et al. The pathway to GTPase activation of elongation factor SelB on the ribosome. *Nature*. 2016;540: 80–85. doi:10.1038/nature20560
62. Koch M, Flür S, Kreutz C, Ennifar E, Micura R, Polacek N. Role of a ribosomal RNA phosphate oxygen during the EF-G-triggered GTP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112: E2561–E2568. doi:10.1073/pnas.1505231112
63. Grela P, Szajwaj M, Horbowicz-Drożdżal P, Tchórzewski M. How Ricin Damages the Ribosome. 2019; 16.
64. Achenbach J-P. *Through the Mirror: Translation with D-amino Acids*. Technische Universität Berlin; 2015.
65. Grela P, Bernadó P, Svergun D, Kwiatowski J, Abramczyk D, Grankowski N, et al. Structural Relationships Among the Ribosomal Stalk Proteins from the Three Domains of Life. *J Mol Evol*. 2008;67: 154–167. doi:10.1007/s00239-008-9132-2

66. Ballesta JPG, Remacha M. The Large Ribosomal Subunit Stalk as a Regulatory Element of the Eukaryotic Translational Machinery. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Elsevier; 1996. pp. 157–193. doi:10.1016/S0079-6603(08)60193-2
67. Gonzalo P, Reboud J-P. The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome. *Biol Cell*. 2003;95: 179–193. doi:10.1016/S0248-4900(03)00034-0
68. Grela P, Krokowski D, Gordiyenko Y, Krowarsch D, Robinson CV, Otlewski J, et al. Biophysical Properties of the Eukaryotic Ribosomal Stalk. *Biochemistry*. 2010;49: 924–933. doi:10.1021/bi901811s
69. Brodersen DE, Nissen P. The social life of ribosomal proteins. *FEBS J*. 2005;272: 2098–2108. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04651.x
70. Wimberly BT, Guymon R, McCutcheon JP, White SW, Ramakrishnan V. A detailed view of a ribosomal active site: the structure of the L11-RNA complex. *Cell*. 1999;97: 491–502. doi:10.1016/s0092-8674(00)80759-x
71. Kavran JM, Steitz TA. Structure of the Base of the L7/L12 Stalk of the Haloarcula marismortui Large Ribosomal Subunit: Analysis of L11 Movements. *J Mol Biol*. 2007;371: 1047–1059. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.091
72. Li I, H V, Ar M, F S, P F, Kh N, et al. Heptameric (L12)<sub>6</sub>/L10 rather than canonical pentameric complexes are found by tandem MS of intact ribosomes from thermophilic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102: 8192–8197. doi:10.1073/pnas.0502193102
73. Maki Y, Hashimoto T, Zhou M, Naganuma T, Ohta J, Nomura T, et al. Three binding sites for stalk protein dimers are generally present in ribosomes from archaeal organism. *J Biol Chem*. 2007;282: 32827–32833. doi:10.1074/jbc.M705412200
74. Guarinos E, Santos C, Sánchez A, Qiu D-Y, Remacha M, Ballesta JPG. Tag-mediated fractionation of yeast ribosome populations proves the monomeric organization of the eukaryotic ribosomal stalk structure. *Mol Microbiol*. 2003;50: 703–712. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03733.x
75. Anger AM, Armache J-P, Berninghausen O, Habeck M, Subklewe M, Wilson DN, et al. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature*. 2013;497: 80–85. doi:10.1038/nature12104
76. Choi AKH, Wong ECK, Lee K-M, Wong K-B. Structures of Eukaryotic Ribosomal Stalk Proteins and Its Complex with Trichosanthin, and Their Implications in Recruiting Ribosome-Inactivating Proteins to the Ribosomes. *Toxins*. 2015;7: 638–647. doi:10.3390/toxins7030638
77. Liljas A, Sanyal S. The enigmatic ribosomal stalk. *Q Rev Biophys*. 2018;51: e12. doi:10.1017/S0033583518000100
78. Traut RR, Dey D, Bochkariov DE, Oleinikov AV, Jokhadze GG, Hamman B, et al. Location and domain structure of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12: site

- specific cysteine crosslinking and attachment of fluorescent probes. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. 1995;73: 949–958. doi:10.1139/o95-102
79. Dey D, Bochkariov DE, Jokhadze GG, Traut RR. Cross-linking of selected residues in the N- and C-terminal domains of *Escherichia coli* protein L7/L12 to other ribosomal proteins and the effect of elongation factor Tu. *J Biol Chem*. 1998;273: 1670–1676. doi:10.1074/jbc.273.3.1670
  80. Bocharov EV, Gudkov AT, Arseniev AS. Topology of the secondary structure elements of ribosomal protein L7/L12 from *E. coli* in solution. *FEBS Lett*. 1996;379: 291–294. doi:10.1016/0014-5793(95)01531-0
  81. Bocharov EV, Gudkov AT, Budovskaya EV, Arseniev AS. Conformational independence of N- and C-domains in ribosomal protein L7/L12 and in the complex with protein L10. *FEBS Lett*. 1998;423: 347–350. doi:10.1016/S0014-5793(98)00121-5
  82. Bocharov EV, Sobol AG, Pavlov KV, Korzhnev DM, Jaravine VA, Gudkov AT, et al. From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J Biol Chem*. 2004;279: 17697–17706. doi:10.1074/jbc.M313384200
  83. C H, Cs M, S S. The ribosomal stalk plays a key role in IF2-mediated association of the ribosomal subunits. *J Mol Biol*. 2010;399: 145–153. doi:10.1016/j.jmb.2010.04.009
  84. Wahl MC, Bourenkov GP, Bartunik HD, Huber R. Flexibility, conformational diversity and two dimerization modes in complexes of ribosomal protein L12. *EMBO J*. 2000;19: 174–186. doi:10.1093/emboj/19.2.174
  85. Mulder FAA, Bouakaz L, Lundell A, Venkataramana M, Liljas A, Akke M, et al. Conformation and dynamics of ribosomal stalk protein L12 in solution and on the ribosome. *Biochemistry*. 2004;43: 5930–5936. doi:10.1021/bi0495331
  86. Leijonmarck M, Liljas A. Structure of the C-terminal domain of the ribosomal protein L7/L12 from *Escherichia coli* at 1.7 Å. *J Mol Biol*. 1987;195: 555–579. doi:10.1016/0022-2836(87)90183-5
  87. Savelsbergh A, Mohr D, Kothe U, Wintermeyer W, Rodnina MV. Control of phosphate release from elongation factor G by ribosomal protein L7/12. *EMBO J*. 2005;24: 4316–4323. doi:10.1038/sj.emboj.7600884
  88. Helgstrand M, Mandava CS, Mulder FAA, Liljas A, Sanyal S, Akke M. The Ribosomal Stalk Binds to Translation Factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a Conserved Region of the L12 C-terminal Domain. *J Mol Biol*. 2007;365: 468–479. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.025
  89. Bushuev VN, Gudkov AT, Liljas A, Sepetov NF. The flexible region of protein L12 from bacterial ribosomes studied by proton nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem*. 1989;264: 4498–4505.
  90. Liljas A, Kirsebom LA, Leijonmarck M. Structural Studies of the Factor Binding Domain. In: Hardesty B, Kramer G, editors. *Structure, Function, and Genetics of*

- Ribosomes. New York, NY: Springer; 1986. pp. 379–390. doi:10.1007/978-1-4612-4884-2\_21
91. Ben-Shem A, Garreau de Loubresse N, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science*. 2011;334: 1524–1529. doi:10.1126/science.1212642
  92. Shimmin LC, Ramirez C, Matheson AT, Dennis PP. Sequence alignment and evolutionary comparison of the L10 equivalent and L12 equivalent ribosomal proteins from archaeobacteria, eubacteria, and eucaryotes. *J Mol Evol*. 1989;29: 448–462. doi:10.1007/BF02602915
  93. Santos C, Ballesta JPG. Characterization of the 26S rRNA-binding domain in *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk phosphoprotein P0. *Mol Microbiol*. 2005;58: 217–226. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04816.x
  94. Mochizuki M, Kitamyō M, Miyoshi T, Ito K, Uchiumi T. Analysis of chimeric ribosomal stalk complexes from eukaryotic and bacterial sources: structural features responsible for specificity of translation factors. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. 2012;17: 273–284. doi:10.1111/j.1365-2443.2012.01586.x
  95. Naganuma T, Nomura N, Yao M, Mochizuki M, Uchiumi T, Tanaka I. Structural basis for translation factor recruitment to the eukaryotic/archaeal ribosomes. *J Biol Chem*. 2010;285: 4747–4756. doi:10.1074/jbc.M109.068098
  96. Inglis AJ, Masson GR, Shao S, Perisic O, McLaughlin SH, Hegde RS, et al. Activation of GCN2 by the ribosomal P-stalk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116: 4946–4954. doi:10.1073/pnas.1813352116
  97. Dever TE. Gene-Specific Regulation by General Translation Factors. *Cell*. 2002;108: 545–556. doi:10.1016/S0092-8674(02)00642-6
  98. Rich BE, Steitz JA. Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. *Mol Cell Biol*. 1987;7: 4065–4074.
  99. Tchórzewski M. The acidic ribosomal P proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34: 911–915. doi:10.1016/S1357-2725(02)00012-2
  100. Wahl MC, Moller W. Structure and Function of the Acidic Ribosomal Stalk Proteins. *Curr Protein Pept Sci*. 2002;3: 93–106. doi:10.2174/1389203023380756
  101. Bielka H, editor. *The Eukaryotic Ribosome*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1982. Available: <https://www.springer.com/gp/book/9783642682742>
  102. Zinker S, Warner JR. The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Phosphorylated and exchangeable proteins. *J Biol Chem*. 1976;251: 1799–1807.
  103. Wool IG, Chan YL, Glück A, Suzuki K. The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1, and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. *Biochimie*. 1991;73: 861–870. doi:10.1016/0300-9084(91)90127-M

104. Bailey-Serres J, Vangala S, Szick K, Lee C. Acidic Phosphoprotein Complex of the 60S Ribosomal Subunit of Maize Seedling Roots (Components and Changes in Response to Flooding). *Plant Physiol.* 1997;114: 1293–1305. doi:10.1104/pp.114.4.1293
105. Szick K, Springer M, Bailey-Serres J. Evolutionary analyses of the 12-kDa acidic ribosomal P-proteins reveal a distinct protein of higher plant ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95: 2378. doi:10.1073/pnas.95.5.2378
106. Tchórzewski M, Boguszewska A, Dukowski P, Grankowski N. Oligomerization properties of the acidic ribosomal P-proteins from *Saccharomyces cerevisiae*: effect of P1A protein phosphorylation on the formation of the P1A-P2B hetero-complex. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2000;1499: 63–73. doi:10.1016/S0167-4889(00)00108-7
107. Planta RJ, Mager WH. The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1998;14: 471–477. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19980330)14:5<471::AID-YEA241>3.0.CO;2-U
108. Abramczyk D, Tchórzewski M, Krokowski D, Boguszewska A, Grankowski N. Overexpression, purification and characterization of the acidic ribosomal P-proteins from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2004;1672: 214–223. doi:10.1016/j.bbagen.2004.04.005
109. Tchórzewski M, Krokowski D, Boguszewska A, Liljas A, Grankowski N. Structural Characterization of Yeast Acidic Ribosomal P Proteins Forming the P1A–P2B Heterocomplex †. *Biochemistry.* 2003;42: 3399–3408. doi:10.1021/bi0206006
110. Zurdo J, Parada P, van den Berg A, Nusspaumer G, Jimenez-Diaz A, Remacha M, et al. Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* Ribosomal Stalk: Binding of P1 Proteins Is Required for the Interaction of P2 Proteins. *Biochemistry.* 2000;39: 8929–8934. doi:10.1021/bi000362j
111. Guarinos E, Remacha M, Ballesta JPG. Asymmetric Interactions between the Acidic P1 and P2 Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Ribosomal Stalk. *J Biol Chem.* 2001;276: 32474–32479. doi:10.1074/jbc.M103229200
112. Lin A, Wittmann-Liebold B, McNally J, Wool IG. The primary structure of the acidic phosphoprotein P2 from rat liver 60 S ribosomal subunits. Comparison with ribosomal “A” proteins from other species. *J Biol Chem.* 1982;257: 9189–9197.
113. Jose MP, Santana-Roman H, Remacha M, Ballesta JP, Zinker S. Eukaryotic acidic phosphoproteins interact with the ribosome through their amino-terminal domain. *Biochemistry.* 1995;34: 7941–7948. doi:10.1021/bi00024a019
114. Lee K-M, Yu CW-H, Chiu TY-H, Sze K-H, Shaw P-C, Wong K-B. Solution structure of the dimerization domain of the eukaryotic stalk P1/P2 complex reveals the structural organization of eukaryotic stalk complex. *Nucleic Acids Res.* 2012;40: 3172–3182. doi:10.1093/nar/gkr1143
115. Lee K-M, Yusa K, Chu L-O, Yu CW-H, Oono M, Miyoshi T, et al. Solution structure of human P1•P2 heterodimer provides insights into the role of eukaryotic stalk in



- recruiting the ribosome-inactivating protein trichosanthin to the ribosome. *Nucleic Acids Res.* 2013;41: 8776–8787. doi:10.1093/nar/gkt636
116. Ballesta JP, Rodriguez-Gabriel MA, Bou G, Briones E, Zambrano R, Remacha M. Phosphorylation of the yeast ribosomal stalk. Functional effects and enzymes involved in the process. *FEMS Microbiol Rev.* 1999;23: 537–550. doi:10.1111/j.1574-6976.1999.tb00412.x
  117. Santos C, Ballesta JPG. The Highly Conserved Protein P0 Carboxyl End Is Essential for Ribosome Activity Only in the Absence of Proteins P1 and P2. *J Biol Chem.* 1995;270: 20608–20614. doi:10.1074/jbc.270.35.20608
  118. Naganuma T, Shiogama K, Uchiumi T. The N-terminal regions of eukaryotic acidic phosphoproteins P1 and P2 are crucial for heterodimerization and assembly into the ribosomal GTPase-associated center. *Genes Cells.* 2007;12: 501–510. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01067.x
  119. Mitroshin IV, Garber MB, Gabdulkhakov AG. Investigation of structure of the ribosomal L12/P stalk. *Biochem Mosc.* 2016;81: 1589–1601. doi:10.1134/S0006297916130022
  120. Hagiya A, Naganuma T, Maki Y, Ohta J, Tohkairin Y, Shimizu T, et al. A Mode of Assembly of P0, P1, and P2 Proteins at the GTPase-associated Center in Animal Ribosome: IN VITRO ANALYSES WITH P0 TRUNCATION MUTANTS. *J Biol Chem.* 2005;280: 39193–39199. doi:10.1074/jbc.M506050200
  121. Uchiumi T, Hori K, Nomura T, Hachimori A. Replacement of L7/L12.L10 protein complex in *Escherichia coli* ribosomes with the eukaryotic counterpart changes the specificity of elongation factor binding. *J Biol Chem.* 1999;274: 27578–27582. doi:10.1074/jbc.274.39.27578
  122. Imai H, Uchiumi T, Kodera N. Direct visualization of translational GTPase factor-pool formed around the archaeal ribosomal P-stalk by high-speed atomic force microscopy. *bioRxiv.* 2020; 2020.06.30.176701. doi:10.1101/2020.06.30.176701
  123. Ito K, Honda T, Suzuki T, Miyoshi T, Murakami R, Yao M, et al. Molecular insights into the interaction of the ribosomal stalk protein with elongation factor 1 $\alpha$ . *Nucleic Acids Res.* 2014;42: 14042–14052. doi:10.1093/nar/gku1248
  124. Tanzawa T, Kato K, Girodat D, Ose T, Kumakura Y, Wieden H-J, et al. The C-terminal helix of ribosomal P stalk recognizes a hydrophobic groove of elongation factor 2 in a novel fashion. *Nucleic Acids Res.* 2018;46: 3232–3244. doi:10.1093/nar/gky115
  125. Murakami R, Singh CR, Morris J, Tang L, Harmon I, Takasu A, et al. The Interaction between the Ribosomal Stalk Proteins and Translation Initiation Factor 5B Promotes Translation Initiation. *Mol Cell Biol.* 2018;38. doi:10.1128/MCB.00067-18
  126. Wool IG. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci.* 1996;21: 164–165. doi:10.1016/S0968-0004(96)20011-8

127. Wawiórka L, Molestak E, Szajwaj M, Michalec-Wawiórka B, Mołoń M, Borkiewicz L, et al. Multiplication of Ribosomal P-Stalk Proteins Contributes to the Fidelity of Translation. *Mol Cell Biol*. 2017;37. doi:10.1128/MCB.00060-17
128. Yacoub A, Kelley MR, Deutsch WA. Drosophila Ribosomal Protein P0 Contains Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Activity. *Nucleic Acids Res*. 1996;24: 4298–4303. doi:10.1093/nar/24.21.4298
129. Grabowski DT, Deutsch WA, Derda D, Kelley MR. Drosophila AP3, a presumptive DNA repair protein, is homologous to human ribosomal associated protein P0. *Nucleic Acids Res*. 1991;19: 4297. doi:10.1093/nar/19.15.4297
130. Frolov MV, Birchler JA. Mutation in P0, a dual function ribosomal protein/apurinic/apyrimidinic endonuclease, modifies gene expression and position effect variegation in Drosophila. *Genetics*. 1998;150: 1487–1495.
131. Deryło K, Michalec-Wawiórka B, Krokowski D, Wawiórka L, Hatzoglou M, Tchórzewski M. The uL10 protein, a component of the ribosomal P-stalk, is released from the ribosome in nucleolar stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018;1865: 34–47. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.10.002
132. Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp H-J, Buck F, Richter D, Kindler S. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J*. 2004;384: 239–246. doi:10.1042/BJ20040812
133. Meier S, Bell M, Lyons DN, Ingram A, Chen J, Gensel JC, et al. Identification of Novel Tau Interactions with Endoplasmic Reticulum Proteins in Alzheimer's Disease Brain. *J Alzheimers Dis*. 2015;48: 687–702. doi:10.3233/JAD-150298
134. Bisbal M, Wojnacki J, Peretti D, Ropolo A, Sesma J, Jausoro I, et al. KIF4 Mediates Anterograde Translocation and Positioning of Ribosomal Constituents to Axons \*. *J Biol Chem*. 2009;284: 9489–9497. doi:10.1074/jbc.M808586200
135. Xia C, Bao Z, Tabassam F, Ma W, Qiu M, Hua S, et al. GCIP, a novel human grap2 and cyclin D interacting protein, regulates E2F-mediated transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2000;275: 20942–20948. doi:10.1074/jbc.M002598200
136. Chang T-W, Chen C-C, Chen K-Y, Su J-H, Chang J-H, Chang M-C. Ribosomal phosphoprotein P0 interacts with GCIP and overexpression of P0 is associated with cellular proliferation in breast and liver carcinoma cells. *Oncogene*. 2008;27: 332–338. doi:10.1038/sj.onc.1210651
137. Haddouk S, Marzouk S, Jallouli M, Fourati H, Frigui M, Hmida YBH, et al. Clinical and diagnostic value of ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2009;48: 953–957. doi:10.1093/rheumatology/kep142
138. Elkon K, Parnassa AP, Foster CL. Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J Exp Med*. 1985;162: 459–471.

139. Artero-Castro A, Castellvi J, García A, Hernández J, Ramón y Cajal S, Lleó ME. Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors. *Hum Pathol.* 2011;42: 194–203. doi:10.1016/j.humpath.2010.04.020
140. Nafziger DA, Recinos RF, Hunter CA, Donelson JE. Patients infected with *Leishmania donovani* chagasi can have antibodies that recognize heat shock and acidic ribosomal proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;49: 325–328. doi:10.1016/0166-6851(91)90076-i
141. Ahn H-J, Kim S, Nam H-W. Molecular cloning of ribosomal P protein in *Toxoplasma gondii* and the availability to detect antibody against recombinant protein in toxoplasmosis patients. *Korean J Parasitol.* 2003;41: 89–96. doi:10.3347/kjp.2003.41.2.89
142. Skeiky YA, Benson DR, Guderian JA, Sleath PR, Parsons M, Reed SG. *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P protein gene family. Novel P proteins encoding unusual cross-reactive epitopes. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1993;151: 5504–5515.
143. Singh S, Sehgal A, Waghmare S, Chakraborty T, Goswami A, Sharma S. Surface expression of the conserved ribosomal protein P0 on parasite and other cells. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;119: 121–124. doi:10.1016/s0166-6851(01)00394-2
144. Achatz G, Oberkofler H, Lechenauer E, Simon B, Unger A, Kandler D, et al. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Mol Immunol.* 1995;32: 213–227. doi:10.1016/0161-5890(94)00108-d
145. Hoff M, Ballmer-Weber BK, Niggemann B, Cistero-Bahima A, San Miguel-Moncín M, Conti A, et al. Molecular cloning and immunological characterisation of potential allergens from the mould *Fusarium culmorum*. *Mol Immunol.* 2003;39: 965–975. doi:10.1016/S0161-5890(03)00026-9
146. Cramer R. Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;115: 99–114. doi:10.1159/000023889
147. Tumer NE, Li X-P. Interaction of ricin and Shiga toxins with ribosomes. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;357: 1–18. doi:10.1007/82\_2011\_174
148. Fabbrini MS, Katayama M, Nakase I, Vago R. Plant Ribosome-Inactivating Proteins: Progresses, Challenges and Biotechnological Applications (and a Few Digressions). *Toxins.* 2017;9. doi:10.3390/toxins9100314
149. Stirpe F, Barbieri L. Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS Lett.* 1986;195: 1–8. doi:10.1016/0014-5793(86)80118-1
150. Reinbothe S, Reinbothe C, Lehmann J, Becker W, Apel K, Parthier B. JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91: 7012–7016.
151. Hey TD, Hartley M, Walsh TA. Maize ribosome-inactivating protein (b-32). Homologs in related species, effects on maize ribosomes, and modulation of activity

- by pro-peptide deletions. *Plant Physiol.* 1995;107: 1323–1332. doi:10.1104/pp.107.4.1323
152. Peumans WJ, Van Damme EJM. Evolution of Plant Ribosome-Inactivating Proteins. In: Lord JM, Hartley MR, editors. *Toxic Plant Proteins*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010. pp. 1–26. doi:10.1007/978-3-642-12176-0\_1
  153. Chen Y, Feng S, Kumar V, Ero R, Gao Y-G. Structure of EF-G-ribosome complex in a pretranslocation state. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20: 1077–1084. doi:10.1038/nsmb.2645
  154. Lord JM, Roberts LM, Robertus JD. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* 1994;8: 201–208. doi:10.1096/fasebj.8.2.8119491
  155. Rong Y, Van Slyke G, Vance DJ, Westfall J, Ehrbar D, Mantis NJ. Spatial location of neutralizing and non-neutralizing B cell epitopes on domain 1 of ricin toxin's binding subunit. Gillet D, editor. *PLOS ONE.* 2017;12: e0180999. doi:10.1371/journal.pone.0180999
  156. Spooner RA, Watson PD, Marsden CJ, Smith DC, Moore KAH, Cook JP, et al. Protein disulphide-isomerase reduces ricin to its A and B chains in the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2004;383: 285–293. doi:10.1042/BJ20040742
  157. Li X-P, Chiou J-C, Remacha M, Ballesta JPG, Tumer NE. A Two-Step Binding Model Proposed for the Electrostatic Interactions of Ricin A Chain with Ribosomes. *Biochemistry.* 2009;48: 3853–3863. doi:10.1021/bi802371h
  158. Spooner RA, Lord JM. How ricin and Shiga toxin reach the cytosol of target cells: retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;357: 19–40. doi:10.1007/82\_2011\_154
  159. Spooner RA, Lord JM. Ricin Trafficking in Cells. *Toxins.* 2015;7: 49–65. doi:10.3390/toxins7010049
  160. Basu D, Tumer NE. Do the A subunits contribute to the differences in the toxicity of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2? *Toxins.* 2015;7: 1467–1485. doi:10.3390/toxins7051467
  161. Li X-P, Kahn PC, Kahn JN, Grela P, Tumer NE. Arginine Residues on the Opposite Side of the Active Site Stimulate the Catalysis of Ribosome Depurination by Ricin A Chain by Interacting with the P-protein Stalk. *J Biol Chem.* 2013;288: 30270–30284. doi:10.1074/jbc.M113.510966
  162. Chiou J-C, Li X-P, Remacha M, Ballesta JPG, Tumer NE. The ribosomal stalk is required for ribosome binding, depurination of the rRNA and cytotoxicity of ricin A chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 2008;70: 1441–1452. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06492.x
  163. Li X-P, Grela P, Krokowski D, Tchórzewski M, Tumer NE. Pentameric Organization of the Ribosomal Stalk Accelerates Recruitment of Ricin A Chain to the Ribosome for Depurination. *J Biol Chem.* 2010;285: 41463–41471. doi:10.1074/jbc.M110.171793

164. May KL, Li X-P, Martínez-Azorín F, Ballesta JPG, Grela P, Tchórzewski M, et al. The P1/P2 proteins of the human ribosomal stalk are required for ribosome binding and depurination by ricin in human cells. *FEBS J.* 2012;279: 3925–3936. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08752.x
165. May KL, Yan Q, Tumer NE. Targeting ricin to the ribosome. *Toxicon.* 2013;69: 143–151. doi:10.1016/j.toxicon.2013.02.001
166. Stirpe F, Bailey S, Miller SP, Bodley JW. Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants. *Nucleic Acids Res.* 1988;16: 1349–1357.
167. Zhang JS, Liu WY. The mechanism of action of trichosanthin on eukaryotic ribosomes--RNA N-glycosidase activity of the cytotoxin. *Nucleic Acids Res.* 1992;20: 1271–1275.
168. Endo Y, Tsurugi K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem.* 1987;262: 8128–8130.
169. Iglesias R, Citores L, Ragucci S, Russo R, Di Maro A, Ferreras JM. Biological and antipathogenic activities of ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2016;1860: 1256–1264. doi:10.1016/j.bbagen.2016.03.011
170. Sowa-Rogozińska N, Sominka H, Nowakowska-Gołacka J, Sandvig K, Słomińska-Wojewódzka M. Intracellular Transport and Cytotoxicity of the Protein Toxin Ricin. *Toxins.* 2019;11. doi:10.3390/toxins11060350
171. Grela P, Li X-P, Horbowicz P, Dźwierzynska M, Tchórzewski M, Tumer NE. Human ribosomal P1-P2 heterodimer represents an optimal docking site for ricin A chain with a prominent role for P1 C-terminus. *Sci Rep.* 2017;7: 5608. doi:10.1038/s41598-017-05675-5
172. Li XP, Kahn JN, Tumer NE. Peptide Mimics of the Ribosomal P Stalk Inhibit the Activity of Ricin A Chain by Preventing Ribosome Binding. *Toxins.* 2018;10. doi:10.3390/toxins10090371
173. Chan DSB, Chu L-O, Lee K-M, Too PHM, Ma K-W, Sze K-H, et al. Interaction between trichosanthin, a ribosome-inactivating protein, and the ribosomal stalk protein P2 by chemical shift perturbation and mutagenesis analyses. *Nucleic Acids Res.* 2007;35: 1660–1672. doi:10.1093/nar/gkm065
174. Too PH-M, Ma MK-W, Mak AN-S, Wong Y-T, Tung CK-C, Zhu G, et al. The C-terminal fragment of the ribosomal P protein complexed to trichosanthin reveals the interaction between the ribosome-inactivating protein and the ribosome. *Nucleic Acids Res.* 2009;37: 602–610. doi:10.1093/nar/gkn922
175. Zhou Y, Li X-P, Kahn JN, Tumer NE. Functional Assays for Measuring the Catalytic Activity of Ribosome Inactivating Proteins. *Toxins.* 2018;10. doi:10.3390/toxins10060240

176. Fan X, Zhu Y, Wang C, Niu L, Teng M, Li X. Structural insights into the interaction of the ribosomal P stalk protein P2 with a type II ribosome-inactivating protein ricin. *Sci Rep.* 2016;6: 37803. doi:10.1038/srep37803
177. Shi W-W, Tang Y-S, Sze S-Y, Zhu Z-N, Wong K-B, Shaw P-C. Crystal Structure of Ribosome-Inactivating Protein Ricin A Chain in Complex with the C-Terminal Peptide of the Ribosomal Stalk Protein P2. *Toxins.* 2016;8. doi:10.3390/toxins8100296
178. Zhou Y, Li X-P, Chen BY, Tumer NE. Ricin uses arginine 235 as an anchor residue to bind to P-proteins of the ribosomal stalk. *Sci Rep.* 2017;7: 42912. doi:10.1038/srep42912
179. Li X-P, Kahn JN, Tumer NE. Peptide Mimics of the Ribosomal P Stalk Inhibit the Activity of Ricin A Chain by Preventing Ribosome Binding. *Toxins.* 2018;10. doi:10.3390/toxins10090371
180. Zhou Y, Li X-P, Kahn JN, McLaughlin JE, Tumer NE. Leucine 232 and hydrophobic residues at the ribosomal P stalk binding site are critical for biological activity of ricin. *Biosci Rep.* 2019;39. doi:10.1042/BSR20192022
181. Green MR, Sambrook J, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
182. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86: 2172–2175. doi:10.1073/pnas.86.7.2172
183. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227: 680–685. doi:10.1038/227680a0
184. Tchórzewski M, Boguszewska A, Abramczyk D, Grankowski N. Overexpression in *Escherichia coli*, Purification, and Characterization of Recombinant 60S Ribosomal Acidic Proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif.* 1999;15: 40–47. doi:10.1006/prep.1998.0997
185. Abramczyk D, Tchórzewski M, Krokowski D, Boguszewska A, Grankowski N. Overexpression, purification and characterization of the acidic ribosomal P-proteins from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2004;1672: 214–223. doi:10.1016/j.bbagen.2004.04.005
186. Greenfield NJ. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc.* 2006;1: 2527–2535. doi:10.1038/nprot.2006.204
187. Grela P, Sawa-Makarska J, Gordiyenko Y, Robinson CV, Grankowski N, Tchórzewski M. Structural Properties of the Human Acidic Ribosomal P Proteins Forming the P1-P2 Heterocomplex. *J Biochem (Tokyo).* 2008;143: 169–177. doi:10.1093/jb/mvm207

188. Sobott F, Hernández H, McCammon MG, Tito MA, Robinson CV. A Tandem Mass Spectrometer for Improved Transmission and Analysis of Large Macromolecular Assemblies. *Anal Chem.* 2002;74: 1402–1407. doi:10.1021/ac0110552
189. Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp H-J, Buck F, Richter D, Kindler S. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J.* 2004;384: 239–246. doi:10.1042/BJ20040812
190. Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, Roth HM, Duhr S, Baaske P, et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Fluoresc Stud Biomol Assoc Process.* 2014;1077: 101–113. doi:10.1016/j.molstruc.2014.03.009
191. Tobias R. Biomolecular Binding Kinetics Assays on the Octet Platform. : 22.
192. Zurdo J, González C, Sanz JM, Rico M, Remacha M, Ballesta JPG. Structural Differences between *Saccharomyces cerevisiae* Ribosomal Stalk Proteins P1 and P2 Support Their Functional Diversity. *Biochemistry.* 2000;39: 8935–8943. doi:10.1021/bi000363b
193. Zurdo J, Sanz JM, González C, Rico M, Ballesta JPG. The Exchangeable Yeast Ribosomal Acidic Protein YP2 $\beta$  Shows Characteristics of a Partly Folded State under Physiological Conditions. *Biochemistry.* 1997;36: 9625–9635. doi:10.1021/bi9702400
194. Kelly SM, Price NC. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1338: 161–185. doi:10.1016/s0167-4838(96)00190-2
195. Grell P, Helgstrand M, Krokowski D, Boguszevska A, Svergun D, Liljas A, et al. Structural characterization of the ribosomal P1A-P2B protein dimer by small-angle X-ray scattering and NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 2007;46: 1988–1998. doi:10.1021/bi0616450
196. Mlsna D, Monzingo AF, Katzin BJ, Ernst S, Robertus JD. Structure of recombinant ricin A chain at 2.3 Å. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 1993;2: 429–435. doi:10.1002/pro.5560020315
197. Weston SA, Tucker AD, Thatcher DR, Derbyshire DJ, Pauptit RA. X-ray structure of recombinant ricin A-chain at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 1994;244: 410–422. doi:10.1006/jmbi.1994.1739
198. Diaconu M, Kothe U, Schlünzen F, Fischer N, Harms JM, Tonevitsky AG, et al. Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell.* 2005;121: 991–1004. doi:10.1016/j.cell.2005.04.015
199. Tchórzewski M. The acidic ribosomal P proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34: 911–915. doi:10.1016/S1357-2725(02)00012-2
200. Wahl MC, Moller W. Structure and Function of the Acidic Ribosomal Stalk Proteins. *Curr Protein Pept Sci.* 2002;3: 93–106. doi:10.2174/1389203023380756

201. Ballesta JPG, Remacha M. The Large Ribosomal Subunit Stalk as a Regulatory Element of the Eukaryotic Translational Machinery. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Elsevier; 1996. pp. 157–193. doi:10.1016/S0079-6603(08)60193-2
202. Grela P, Krokowski D, Gordiyenko Y, Krowarsch D, Robinson CV, Otlewski J, et al. Biophysical Properties of the Eukaryotic Ribosomal Stalk. *Biochemistry*. 2010;49: 924–933. doi:10.1021/bi901811s
203. Gonzalo P, Reboud J-P. The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome. *Biol Cell*. 2003;95: 179–193. doi:10.1016/S0248-4900(03)00034-0
204. Lee K-M, Yusa K, Chu L-O, Yu CW-H, Oono M, Miyoshi T, et al. Solution structure of human P1•P2 heterodimer provides insights into the role of eukaryotic stalk in recruiting the ribosome-inactivating protein trichosanthin to the ribosome. *Nucleic Acids Res*. 2013;41: 8776–8787. doi:10.1093/nar/gkt636
205. Hasler P, Brothl N, Weissbachll H, ParnassaS AP, Elkon K. Ribosomal Proteins P0, P1, and P2 Are Phosphorylatedby Casein Kinase II at Their Conserved CarboxylTermini. : 6.
206. Ito K, Honda T, Suzuki T, Miyoshi T, Murakami R, Yao M, et al. Molecular insights into the interaction of the ribosomal stalk protein with elongation factor 1 $\alpha$ . *Nucleic Acids Res*. 2014;42: 14042–14052. doi:10.1093/nar/gku1248
207. Nomura N, Honda T, Baba K, Naganuma T, Tanzawa T, Arisaka F, et al. Archaeal ribosomal stalk protein interacts with translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C terminus. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109: 3748–3753. doi:10.1073/pnas.1112934109
208. Chan DSB, Chu L-O, Lee K-M, Too PHM, Ma K-W, Sze K-H, et al. Interaction between trichosanthin, a ribosome-inactivating protein, and the ribosomal stalk protein P2 by chemical shift perturbation and mutagenesis analyses. *Nucleic Acids Res*. 2007;35: 1660–1672. doi:10.1093/nar/gkm065
209. Chan S-H, Hung FS-J, Chan DS-B, Shaw P-C. Trichosanthin interacts with acidic ribosomal proteins P0 and P1 and mitotic checkpoint protein MAD2B. *Eur J Biochem*. 2001;268: 2107–2112. doi:https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02091.x
210. McCluskey AJ, Poon GMK, Bolewska-Pedyczak E, Srikumar T, Jeram SM, Raught B, et al. The catalytic subunit of shiga-like toxin 1 interacts with ribosomal stalk proteins and is inhibited by their conserved C-terminal domain. *J Mol Biol*. 2008;378: 375–386. doi:10.1016/j.jmb.2008.02.014
211. Shi W-W, Tang Y-S, Sze S-Y, Zhu Z-N, Wong K-B, Shaw P-C. Crystal Structure of Ribosome-Inactivating Protein Ricin A Chain in Complex with the C-Terminal Peptide of the Ribosomal Stalk Protein P2. *Toxins*. 2016;8: 296. doi:10.3390/toxins8100296
212. Tchórzewski M, Boguszewska A, Abramczyk D, Grankowski N. Overexpression in *Escherichia coli*, Purification, and Characterization of Recombinant 60S Ribosomal



- Acidic Proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif.* 1999;15: 40–47. doi:10.1006/prep.1998.0997
213. Tabor S, Richardson CC. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci.* 1985;82: 1074–1078. doi:10.1073/pnas.82.4.1074
  214. Olins PO, Devine CS, Rangwala SH, Kavka KS. The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in *Escherichia coli*. *Gene.* 1988;73: 227–235. doi:10.1016/0378-1119(88)90329-0
  215. Tchórzewski M, Krokowski D, Boguszewska A, Liljas A, Grankowski N. Structural characterization of yeast acidic ribosomal P proteins forming the P1A-P2B heterocomplex. *Biochemistry.* 2003;42: 3399–3408. doi:10.1021/bi0206006
  216. Shimizu T, Nakagaki M, Nishi Y, Kobayashi Y, Hachimori A, Uchiumi T. Interaction among silkworm ribosomal proteins P1, P2 and P0 required for functional protein binding to the GTPase-associated domain of 28S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 2002;30: 2620–2627. doi:10.1093/nar/gkf379
  217. Tchórzewski M, Boguszewska A, Dukowski P, Grankowski N. Oligomerization properties of the acidic ribosomal P-proteins from *Saccharomyces cerevisiae*: effect of P1A protein phosphorylation on the formation of the P1A-P2B hetero-complex. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2000;1499: 63–73. doi:10.1016/S0167-4889(00)00108-7
  218. Uchiumi T, Kominami R. Binding of Mammalian Ribosomal Protein Complex P0·P1·P2 and Protein L12 to the GTPase-associated Domain of 28 S Ribosomal RNA and Effect on the Accessibility to Anti-28 S RNA Autoantibody\*. *J Biol Chem.* 1997;272: 3302–3308. doi:10.1074/jbc.272.6.3302
  219. Bernadó P, Modig K, Grela P, Svergun DI, Tchórzewski M, Pons M, et al. Structure and Dynamics of Ribosomal Protein L12: An Ensemble Model Based on SAXS and NMR Relaxation. *Biophys J.* 2010;98: 2374–2382. doi:10.1016/j.bpj.2010.02.012
  220. Tchórzewski M, Boldyreff B, Issinger OG, Grankowski N. Analysis of the protein-protein interactions between the human acidic ribosomal P-proteins: evaluation by the two hybrid system. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32: 737–746. doi:10.1016/s1357-2725(00)00017-0
  221. Gonzalo P, Lavergne J-P, Reboud J-P. Pivotal Role of the P1 N-terminal Domain in the Assembly of the Mammalian Ribosomal Stalk and in the Proteosynthetic Activity\*. *J Biol Chem.* 2001;276: 19762–19769. doi:10.1074/jbc.M101398200
  222. Guarinos E, Remacha M, Ballesta JPG. Asymmetric Interactions between the Acidic P1 and P2 Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Ribosomal Stalk. *J Biol Chem.* 2001;276: 32474–32479. doi:10.1074/jbc.M103229200
  223. Nissen P. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science.* 2000;289: 920–930. doi:10.1126/science.289.5481.920

224. Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vonnheim C, et al. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 2000;407: 327–339. doi:10.1038/35030006
225. Arisue N, Maki Y, Yoshida H, Wada A, Sanchez-Madrid LidyaB, Moller W, et al. Comparative Analysis of the Ribosomal Components of the Hydrogenosome-Containing Protist, *Trichomonas vaginalis*. *J Mol Evol*. 2004;59. doi:10.1007/s00239-004-2604-0
226. Stanislav Nikonov, Nikulin A, Eliseikina I, Tishchenko S, Nevskaya N, Davydova N, et al. Structure of the L1 protuberance in the ribosome. *Nat Struct Biol*. 2003;10: 104–108. doi:10.1038/nsb886
227. As P, Cr B, E H, Y X, Cc W, C H, et al. Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2013;41: 7522–7535. doi:10.1093/nar/gkt513