



UMCS

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Biotechnologii

Kierunek: **Biologia**

Eliza Molestak

Analiza funkcjonalna rybosomalnych białek-P na modelu *Saccharomyces cerevisiae*

(Functional analysis of ribosomal P proteins in a
Saccharomyces cerevisiae model)

ROZPRAWA DOKTORSKA

wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej

promotor: Prof. dr hab. Marek Tchórzewski

promotor pomocniczy: dr Leszek Wawiórka

LUBLIN 2019

Rodzicom, Mężowi, Dzieciom

*Pragnę serdecznie podziękować
Panu Prof. dr hab. Markowi Tchórzewskiemu
za stworzenie możliwości realizowania ciekawych projektów,
cierpliwość, opiekę merytoryczną
oraz pomoc w napisaniu niniejszej pracy.*

*Pragnę również serdecznie podziękować
Panu dr Leszkowi Wawiórcę
za cierpliwość, opiekę merytoryczną
oraz pomoc w napisaniu niniejszej pracy*

*Dziękuję
Panu Prof. dr hab. Nikodemowi Grankowskiemu
za cenne uwagi podczas pisania pracy
oraz wszystkim pracownikom Zakładu Biologii Molekularnej
za okazaną życzliwość i wszechstronną pomoc*

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	6
I. WSTĘP	9
1. Struktura rybosomu	9
1.1. Struktura i funkcja centrum GTPazowego.....	13
2. Rola centrum GTPazowego w procesie translacji	21
2.1. Regulacja aktywności centrum GTPazowego a białka P.....	29
3. Poza-translacyjne funkcje białek P	32
II. CEL PRACY	35
III. MATERIAŁY I METODY	36
1. Manipulacje genetyczne	36
2. Hodowle komórkowe drożdży	36
3. Metoda oznaczenia długości życia oraz potencjału reprodukcyjnego szczepów drożdżowych	37
4. Metoda analizy cyklu komórkowego.....	39
5. Immunodetekcja białek	39
6. Metoda uzyskania profili polisomów	40
7. Metoda analizy wydajności procesu translacji	42
8. Metoda oznaczenia precyzji dekodowania informacji genetycznej	43
9. Inne metody	47
IV. WYNIKI	48
1. Charakterystyka mutantów drożdżowych	48
1.1. Charakterystyka fenotypowa	51
1.2. Analiza wpływu białek P na metabolizm komórki	58
2. Analiza ilościowa i jakościowa poszczególnych etapów translacji	61
2.1. Analiza ilościowa procesu biosyntezy białka.....	61
2.2. Analiza jakościowa procesu translacji - analiza polisomów	65
2.3. Antybiotyki - molekularne sody w analizie funkcjonalnej procesu translacji.....	69
3. Wpływ rybosomalnych białek P na precyzję dekodowania informacji genetycznej przez rybosom eukariotyczny	81
V. DYSKUSJA	87
PODSUMOWANIE	100
VI. LITERATURA	107

STRESZCZENIE

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy określenia funkcji multiplikacji rybosomalnych białek P, które stanowią główny element białkowy eukariotycznego centrum GTPazowego - GAC, ang. „*GTPase Associated Center*”. Centrum to znajduje się na dużej podjednostce rybosomalnej, a jego funkcja polega na wiązaniu i stymulacji aktywności GTPazowej czynników translacyjnych, tzw. trGTPaz. GAC jest odpowiedzialny za uwolnienie energii zgromadzonej w GTP, która jest głównym motorem napędowym w funkcjonowaniu rybosomu i zapewnia jednokierunkowość procesu translacji. Eukariotyczne białka P tworzą dwa hetero-dimery P1-P2, które nie oddziałują bezpośrednio z rybosomalnym RNA, ale wiążą się z rybosomem za pośrednictwem białka uL10, tworząc pentameryczny kompleks uL10-(P1-P2)₂. W komórkach drożdżowych kompleks ten posiada zmodyfikowaną konfigurację, uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A). Unikatową cechą białek P wchodzących w skład kompleksu jest ich multiplikacja, a przede wszystkim powielenie tzw. domen P, które zawierają konserwatywny C-terminalny fragment, odpowiedzialny za bezpośrednie oddziaływanie z trGTPazami. W eukariotycznym kompleksie uL10-(P1-P2)₂ występuje pięć identycznych C-końcowych fragmentów; cztery pochodzą z dwóch dimerów P1-P2 oraz piąty z domeny P w białku uL10. Obecność tylko jednego takiego elementu na rybosomie wystarcza do stymulacji, zależnej od czynników translacyjnych, hydrolizy GTP *in vitro* co zapewnia przebieg biosyntezy białka i żywotność komórek.

Celem pracy jest poznanie funkcji eukariotycznych białek P, a przede wszystkim roli multiplikacji tych białek w aspekcie działania maszynerii translacyjnej.

Jako model badawczy wykorzystano komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, tj. zestaw mutantów na bazie szczepu BY4741, które posiadały zmodyfikowaną konfigurację kompleksu białek P. Wykorzystano trzy szczepy drożdżowe, BY4741 posiadający niezmieniony kompleks w formie uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A), oraz mutanty: uL10_{Δh2} oraz uL10_{Δh1h2} posiadające konfigurację kompleksu odpowiednio, uL10-(P1A-P2B) i uL10. Realizację zadań badawczych rozpoczęto od charakterystyki fenotypowej otrzymanych mutantów drożdżowych. Zaobserwowano, że szczep drożdżowy uL10_{Δh1h2}, w którym rybosomy pozbawione są wszystkich białek P charakteryzuje się powolnym wzrostem, a cecha

ta związana jest z zaburzeniami w cyklu komórkowym, w fazie G1, czego rezultatem jest znacznie wydłużony czas generacji komórki drożdżowej. Analizy fenotypowe wykazały ponadto, że mutant uL10 Δ h1h2 wykazuje defekt metaboliczny, tj. nie wykorzystuje tzw. niefermentowalnych źródeł węgla, jak etanol czy glicerol. Następne kroki to analizy skierowane na opisanie funkcjonowania maszynerii translacyjnej w aspekcie ilościowym jak i jakościowym. Analizy ilościowe, czyli określenie wydajności translacji na poszczególnych jej etapach. Wykorzystano takie analizy jak „profile polisomów” w tym analizę „runoff” oraz „half transit time”. Analizy te wykazały, że brak białek P na rybosomie nie zaburza efektywności translacji na poszczególnych etapach cyklu translacyjnego. Jednakże, najbardziej zaskakujący wynik otrzymano na bazie analiz jakościowych wskazując, że rybosomy z defektywnym kompleksem białek P wykazują zaburzenia w precyzji dekodowania informacji genetycznej. Analizy te wykonano na bazie systemu dwóch lucyferaz jako układ reporterowy („Dual Luciferase Assay Reporter System”). Wykazano, że zakłócenie architektury kompleksu wpływa w szczególności na proces dekodowania, tj. wprowadzenie błędnego aminokwasu „misincorporation”, supresji kodonu stop „read-through” czy przesunięcie ramki odczytu o 1 nukleotyd w kierunku 3’, tzw. +1 „frameshifting”. Wyniki analiz oparte na systemie reporterowych lucyferaz, poparte są obserwacjami wskazującymi, że mutant drożdżowy pozbawiony białek P jest nadwrażliwy na antybiotyki z grupy aminoglikozydów, które upośledzają proces dekodowania. Pokazuje to synergistyczny efekt między defektem dekodowania wynikającym z niedoboru białek P a stosowanym aminoglikozydem. Analizy te, co istotne, pokazują korelację między liczbą kopii białek P na rybosomie i wpływem na dokładność tłumaczenia informacji genetycznej przez rybosom. Zubożenie rybosomu o jeden dimer P1-P2, to jedynie umiarkowany defekt dekodowania, podczas gdy już brak dwóch dimerów powodowało znaczny wzrost częstotliwości mylenia się rybosomu. Ponadto, analizy działania maszynerii translacyjnej wskazały, że mutant drożdżowy z zaburzeniami w architekturze kompleksu białek P nabywa oporności na sordarin; specyficzny antybiotyk działający na grzyby, rzucając nieco więcej światła na molekularny aspekt działania tego antybiotyku.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że multiplikacja białek P, a przede wszystkim obecność pięciu charakterystycznych C-terminalnych fragmentów białek P1/P2 i białka uL10, odgrywa istotną rolę

w procesie dekodowania informacji genetycznej przez rybosom. Zatem, można stwierdzić, że główną rolą multiplikacji białek P jest funkcjonalne sprzężenie z jakościowym aspektem działania rybosomu, tj. dekodowaniem informacji genetycznej. Ponadto, badania te niosą w sobie aspekt aplikacyjny, ponieważ wskazują, że kompleks białek P może odgrywać istotną rolę w oddziaływaniu sordarinu z rybosomem. Wynik ten, otwiera drogę do poznania podstaw molekularnych działania sordarinu na maszynę translacyjną, a tym samym opracowanie efektywnych anty-grzybiczych antybiotyków.

I. WSTĘP

Funkcjonalną strukturą komórkową warunkującą biosyntezę białka jest rybosom. Jest to kompleks białkowo-rybonukleinowy, którego zasadniczą funkcją jest dekodowanie informacji genetycznej zawartej w mRNA i kataliza syntezy wiązania peptydowego w białkach. Chociaż pierwsze wzmianki na temat tej makromolekuły pojawiły się w latach czterdziestych XX wieku [1], nadal jest ona obiektem intensywnych badań świata naukowego. Rozwój technik badawczych ostatnich lat, takich jak krystalografia rentgenowska czy mikroskopia krioelektronowa, pozwoliły na poznanie struktury i zrozumienie funkcjonowania rybosomu w nano-skali, jednakże molekularne aspekty biosyntezy białka i rola maszynerii translacyjnej w regulacji metabolizmu komórki nadal skrywają wiele tajemnic [2].

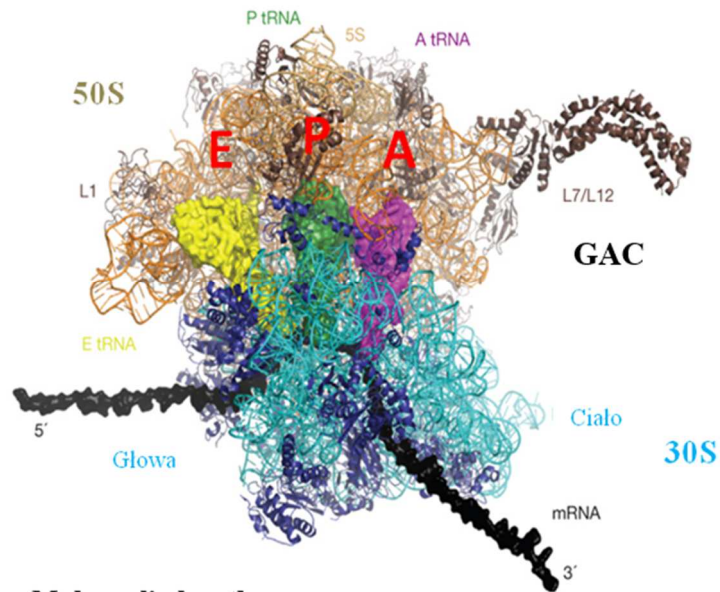
1. STRUKTURA RYBOSOMU

Obecna wiedza na temat struktury i funkcji rybosomu jest wynikiem wieloletnich biochemicznych, biofizycznych i strukturalnych badań [3]. Zarówno rybosom bakteryjny o stałej sedymentacji 70S, jak i eukariotyczny o stałej sedymentacji 80S są zespołami dwóch składowych: rybosomalnego RNA (rRNA) i białek. W skład małej podjednostki rybosomu bakteryjnego (30S) wchodzi cząsteczka 16S rRNA i 21 rybosomalnych białek, natomiast dużą podjednostkę (50S) budują odpowiednio cząsteczki 5S, 23S rRNA oraz 33 białka [4]. Mała podjednostka rybosomu eukariotycznego (40S) zawiera 18S rRNA oraz 32 białka natomiast duża podjednostka (60S) zbudowana jest z odpowiednio 5S, 25/28S rRNA oraz dodatkowej cząsteczki rRNA - 5.8S i 45 białek [4, 5]. Pomimo wspólnej historii i wysokiej konserwatywności w zasadniczych elementach rybosomu, istnieje znaczące jego zróżnicowanie ewolucyjne między poszczególnymi domenami życia. Spośród eukariotycznych białek rybosomalnych, 32 nie mają homologów w strukturach bakteryjnych lub archeonów, zaś białka homologiczne często zawierają specyficzne dodatkowe elementy topologiczne, które nadają im specyficzność w poszczególnych domenach życia [6].

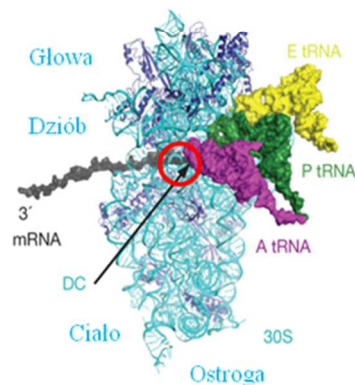
W strukturze małej podjednostki rybosomalnej we wszystkich domenach życia możemy wyróżnić charakterystyczne elementy strukturalne tj. głowę, ramię, dziób, platformę, ciało, ostrogę natomiast w obrębie dużej podjednostki centralną

wyniosłość, wyniosłość boczną L1 oraz wyniosłość boczną określaną mianem tzw. „kciuka” rybosomalnego (ang. „*ribosomal stalk*”) [5]. Pomimo różnic pomiędzy rybosomami z różnych domen życia struktura rdzenia i mechanizm działania są homologiczne (Fig. 1).

Escherichia coli



Mała podjednostka



Duża podjednostka

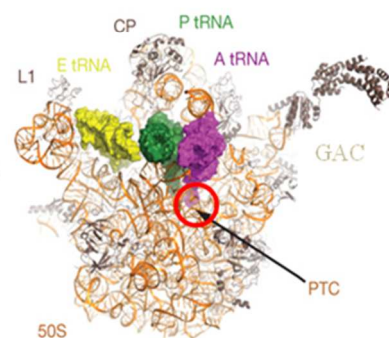


Fig. 1. Struktura rybosomu bakteryjnego [7]. Panel górny: struktura rybosomu bakteryjnego 70S wraz z mRNA (kolor czarny) oraz tRNA w miejscu A (miejsce wiązania aminoacylo-tRNA, kolor różowy), P (miejsce wiązania tRNA wraz z syntetyzowanym polipeptydem, kolor zielony) i E (miejsce wiązania zdeacylowanego tRNA, kolor żółty). Duża podjednostka 50S - kolor brązowy, mała podjednostka 30S - kolor jasnoniebieski. Panel dolny lewy: mała podjednostka 30S z zaznaczonym centrum dekodującym (DC); panel dolny prawy: duża podjednostka 50S z zaznaczonym centrum peptydylotransferazy (PTC). GAC - centrum GTPazowe (ang. „*GTPase Associated Center*”).

Na podstawie licznych prac badawczych, a przede wszystkim wysokorozdzielczych struktur rybosomu opracowanych technikami krystalograficznymi wyróżniono trzy miejsca wiązania cząsteczki tRNA: akceptorowe (miejsce A), do którego przyłącza się aminoacylo-tRNA (aa-tRNA); peptydylowe (miejsce P), do którego podczas procesu inicjacji przyłącza się inicjatorowy tRNA, a w czasie elongacji zakotwiczony jest peptydylo-tRNA oraz miejsce wyjścia dla deacylowanego tRNA (miejsce E) (Fig. 1) [8].

Podstawowa aktywność translacyjna rybosomu realizowana jest w obrębie jego trzech funkcjonalnych miejsc aktywnych: centrum dekodującego (DC, ang. „*Decoding Center*”) [9], centrum peptydylotransferazy (PTC, ang. „*Peptidyl Transferase Center*”) [10] oraz centrum GTPazowego (GAC, ang. „*GTPase Associated Center*”) [11]. Centrum dekodujące zlokalizowane jest na małej podjednostce rybosomu i odpowiada za dekodowanie informacji genetycznej zawartej w sekwencji mRNA [9]. Centrum to zbudowane jest wyłącznie z fragmentów helis 44, 18 oraz 34 16S rRNA, zaś uS12 to jedyne białko rybosomalne jakie znajduje się blisko centrum dekodującego i pełni w tym procesie pośrednią rolę wspomagającą (Fig. 2).

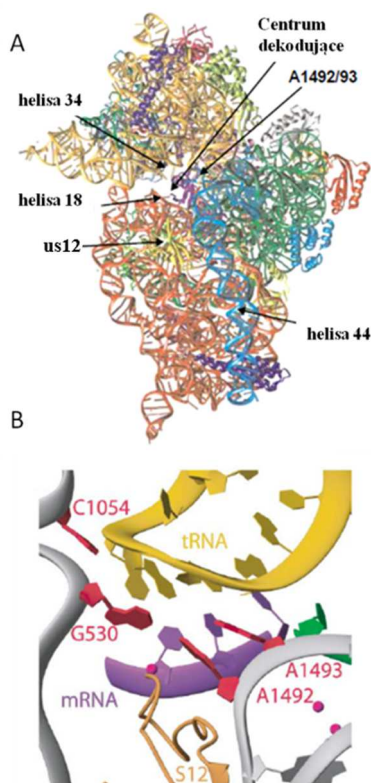


Fig. 2. Centrum dekodujące rybosomu na podjednostce 30S.

A [8]: Struktura 30S z *Thermus thermophilus* opracowana metodą krystalografii. Różnymi kolorami zaznaczono trzy główne domeny 16S rRNA tworzące centrum dekodujące oraz białko uS12.

B [12]: Centrum dekodujące z zaznaczonymi pozycjami konserwatywnych zasad A1492, A1493 i G530 na 16S rRNA uczestniczących w tzw. weryfikacji strukturalnej tj. rozpoznawaniu kompleksu kodon-antykonon. Kodon mRNA znajdujący się w miejscu A (fioletowy), pętla antykononowa tRNA (żółty), 16S rRNA (szary), nukleotydy A1492 i A1493 oraz G530 weryfikujące strukturalne oddziaływanie kodon-antykonon oznaczono kolorem różowym.

W trakcie dekodowania mRNA nukleotydy A1492, A1493 oraz G530 16S rRNA oddziałują z kompleksem mRNA-tRNA „odczytując”, na zasadzie molekularnej weryfikacji, poprawność parowania kodon-antykonon i formowanie dupleksu. Zjawisko to stanowi zasadniczą aktywność rybosomu w procesie odczytu informacji co jednocześnie zapewnia wysoką precyzję dekodowania informacji genetycznej (Fig. 2B) [8].

Centrum peptydylotransferazy formowane jest przez cząsteczkę rRNA wchodzącego w skład dużej podjednostki rybosomalnej a podstawową funkcją tego centrum jest udział w procesie tworzenia wiązania peptydowego i uczestnictwo w uwalnianiu nowo syntetyzowanych peptydów [13]. Tworzenie wiązania peptydowego w obrębie PTC zachodzi spontanicznie a rolą rybosomu jest jedynie organizacja strukturalna dwóch substratów, tj. peptydylo-tRNA w miejscu P i aa-tRNA w miejscu A. Zatem, z punktu widzenia klasycznej katalizy enzymatycznej, nie następuje obniżenie energii aktywacji a jedynie spadek entropii układu [14] (Fig. 3).

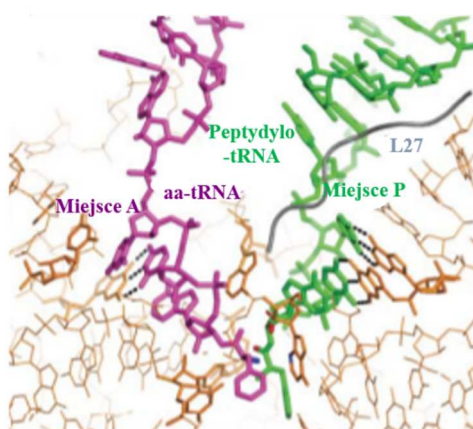


Fig. 3. Centrum peptydylotransferazy [15]. Substraty: aa-tRNA w miejscu A oraz peptydylo-tRNA w miejscu P oznaczono odpowiednio kolorem różowym oraz zielonym.

Odpowiednie pozycjonowanie w PTC kolejnego aminokwasu względem tworzonych polipeptydu prowadzi do spontanicznego formowania wiązania peptydowego, między grupą aminową aminokwasu dołączonego do tRNA w miejscu A a grupą karbonylową ostatniego aminokwasu na peptydylo-tRNA w miejscu P. Należy podkreślić, że w reakcji tej nie bierze czynnego udziału żaden czynnik translacyjny ani też żadne białko rybosomalne oraz rRNA [16]. Na podstawie symulacji komputerowych PTC i analiz biochemicznych zasugerowano, że jedynie N-końcowa grupa α -aminowa białka bL27, w rybosomie *Escherichia coli*,

może być zaangażowana w reakcji tworzenia wiązania peptydowego, jednakże nie jest to udział aktywny w katalizie [17]. W związku z tym, że dominującym elementem w dwóch kluczowych procesach realizowanych przez rybosom jest rRNA, można go traktować jak rybozym.

Kolejnym centrum aktywnym rybosomu zlokalizowanym w obrębie dużej podjednostki jest centrum GTPazowe. Jego funkcja polega na wiązaniu i stymulacji aktywności GTPazowej czynników translacyjnych, tzw. translacyjnych GTPaz (trGTPaz), dzięki którym proces translacji przebiega wydajnie. Centrum to jest odpowiedzialne za konwersję energii chemicznej, zgromadzonej w wysokoenergetycznym wiązaniu w obrębie cząsteczki GTP, w energię kinetyczną warunkującą jednokierunkowość procesu translacji [18, 19].

1.1.Struktura i funkcja centrum GTPazowego

W odróżnieniu do centrum dekodującego oraz centrum peptydylotransferazy, które zbudowane są wyłącznie z rRNA, funkcjonowanie elementu GAC opiera się na współdziałaniu rRNA i białek rybosomalnych [20]. Komponent rybonukleinowy stanowią dwa fragmenty rRNA; tzw. pętla sarcynowo-rycynowa (SRL, ang. „*Sarcin-Ricin Loop*”) oraz pętla tiostreptonowa (TL, ang. „*Thiostrepton Loop*”). Element białkowy centrum GTPazowego na rybosomie stanowi oligomeryczna struktura tworząca boczną wyniosłość rybosomalną zwaną „kciukiem”. U eukariontów jest to kompleks rybosomalnych białek P oraz rybosomalne białko uL11 [11, 21]. Kompleks białek P połączony jest z rybosomem poprzez konserwatywny region rRNA zwany pętlą tiostreptonową, za pośrednictwem białka uL10 [11, 22].

Pętla sarcynowo-rycynowa jest jedną z najsilniej ewolucyjnie konserwowanych sekwencji rRNA będąca elementem helisy 95 na 23S rRNA (nukleotydy C2646- G2674 u *Escherichia coli*) [23] (Fig. 4A) czy 28S rRNA (nukleotydy A4308-A4339 u szczura) [24]. W skład SRL wchodzi sekwencja 12 nukleotydów (AGUACGAGAGGA), która jest charakterystyczna dla rRNA we wszystkich organizmach żywych. Pętla sarcynowo-rycynowa odgrywa zasadniczą rolę w aktywności rybosomu poprzez bezpośrednią stymulację hydrolizy GTP katalizowanej przez czynniki translacyjne - trGTPazy [19]. SRL oddziałuje bezpośrednio na domenę G trGTPaz, która jest odpowiedzialna

za hydrolizę GTP, a mechanizm molekularny polega na otwarciu tzw. „bramki hydrofobowej” i prawidłowym pozycjonowaniu specyficznej reszty histydynowej umożliwiając cząsteczce wody nukleofilowy atak na wiązanie γ -fosforanowe GTP (Fig. 4B). Ze względu na swoją kluczową rolę w stymulacji hydrolizy GTP w stosunku do wielu czynników translacyjnych, pętla sarcynowo-rycynowa stała się również celem dla toksyn takich jak α -sarcyna czy rycyna, które poprzez modyfikacje SRL hamują proces translacji, a końcowym efektem jest śmierć komórki eukariotycznej [25, 26, 27, 28]. Hydroliza wiązania fosfodiesterowego pomiędzy G2661-A2662 (numeracja *E. coli*) przez α -sarcynę czy też specyficzna depurynacja adeniny A2660 (numeracja *E. coli*) rRNA i A4324 (numeracja 28S rRNA szczura) przez rycynę prowadzi do zahamowania hydrolizy GTP zależnej od trGTPaz, a w konsekwencji do hamowania syntezy białek i śmierci komórki (Fig. 4A) [28, 29].

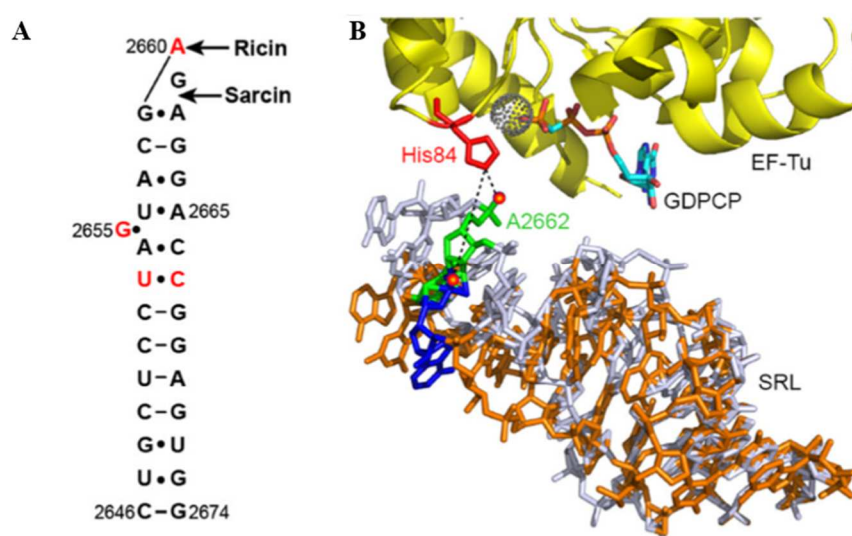


Fig. 4. Interakcja SRL z białkowym czynnikiem elongacyjnym EF-Tu *E. coli* [30].

A: Drugorzędowa struktura SRL. Kolorem czerwonym zaznaczono nukleotydy A2660, G2655, U2553, C2667. Miejsca będące celem dla rycyny lub α -sarcyny zaznaczono strzałką. B: Strukturalny model przedstawiający fragment interakcji SRL z czynnikiem elongacyjnym EF-Tu w kompleksie z GTP (GDPCP) i aa-tRNA. Kolorem czerwonym zaznaczono katalityczną His84 w EF-Tu, na zielono nukleotyd A2662 i niebiesko A2660 w SRL odgrywające kluczową rolę w pozycjonowaniu reszty His84.

Białkowy komponent centrum GTP-azowego możemy podzielić na dwie funkcjonalne i ewolucyjnie odrębne części: podstawę „kciuka” rybosomalnego

i część boczną [11, 22] Podstawę „kciuka” stanowią białka uL11 (wcześniejsza nazwa L11/L12 odpowiednio u prokariotów i eukariotów) [31] oraz fragment kotwiczący białka P, tj. uL10 (wcześniej L10/P0 odpowiednio u prokariotów i eukariotów) [31] wiążący w formie kompleksu oligomerycznego pozostałe białka „kciuka” do rybosomu (Fig. 5 i 6). U prokariotów boczna część „kciuka” zbudowana jest z homo-dimerów białka bL12 (wcześniej L12), których stechiometria jest zróżnicowana (Fig. 5) [31]. W przypadku eukariotów, występują wyłącznie hetero-dimery białek P1-P2 (Fig. 6) zakotwiczonych na C-terminalnej domenie białka uL10, tworząc pentamer uL10(P1-P2)₂. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż białka te, należą do unikalnych komponentów rybosomalnych, ponieważ nie oddziałują bezpośrednio z rRNA, ale wiążą się z rybosomem za pośrednictwem białka uL10. Ponadto ich kopie są zwielowokrotnione, w przeciwieństwie do pozostałych białek rybosomalnych, które występują w jednej kopii na rybosomie [11, 32, 33, 34].

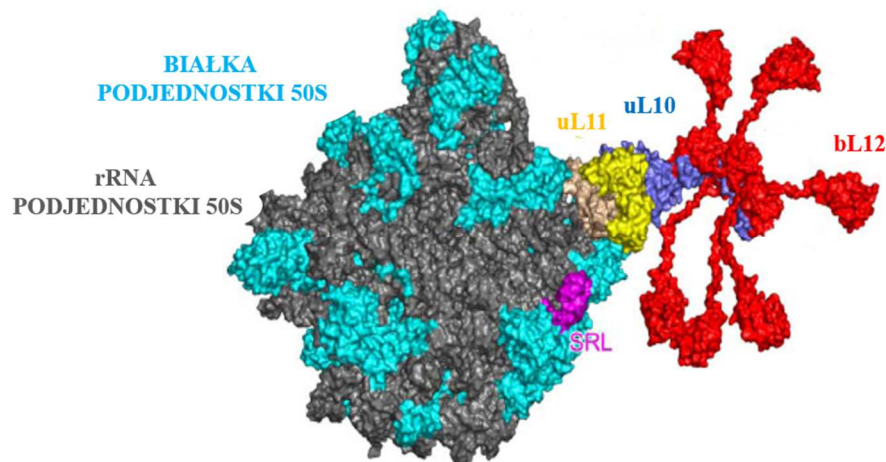


Fig. 5. Prokariotyczne centrum GTPazowe (GAC) [20]. Struktura podjednostki 50S. Białka podjednostki 50S zaznaczono kolorem turkusowym, białka „kciuka” rybosomalnego: dimery białek bL12 kolorem czerwonym, białko uL10 kolorem niebieskim, zaś uL11 kolorem żółtym. rRNA podjednostki zaznaczono kolorem szarym, SRL - pętla sarcynowo-rycynowa (kolor różowy).

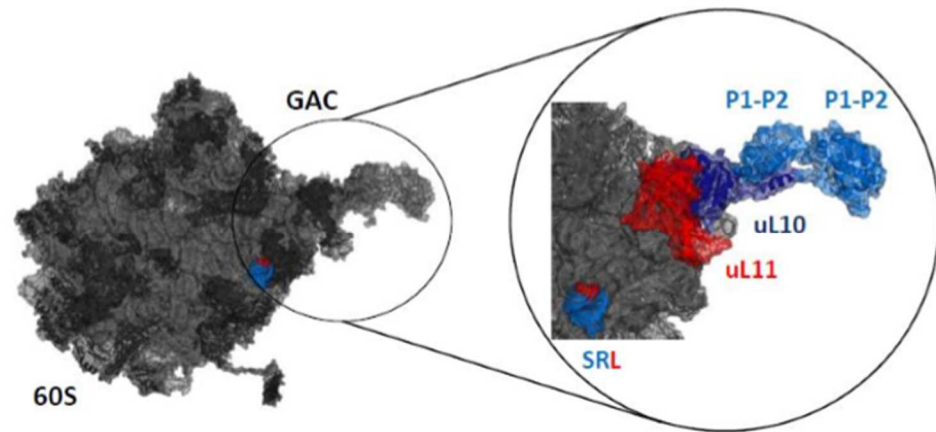


Fig. 6. Eukariotyczne centrum GTPazowe (GAC). Lewy panel: struktura podjednostki 60S opracowana metodą krystalograficzną z zakreślonym regionem GAC. Prawy panel: struktura GAC: SRL - pętla sarcynowo-rycynowa (kolor niebiesko-czerwony); białko uL11 (czerwony); uL10 (ciemnoniebieski); dimery P1-P2 (jasnoniebieski), model wykonany z użyciem programu PyMol.

„Kciuk” rybosomalny wchodzi w bezpośrednią interakcję z translacyjnymi GTPazami i odpowiada za stymulację ich GTPazowej aktywności. W obrębie trzech domen życia, kompleks białek formujących rybosomalną wyniosłość boczną, wykazuje zmienność w zakresie kompozycji, stechiometrii i właściwości topologicznych [11, 22]. I tak, u prokariotów pentamer uL10-(bL12)₄ występuje u bakterii mezofilnych (Fig. 7, lewy panel), heptamer uL10-(P1-P2)₃ u bakterii termofilnych [35] natomiast u wybranych cyjanobakterii opisano strukturę oktameryczną uL10-(bL12)₄ [35]. U eukariotów występuje pentamer uL10-(P1-P2)₂ (Fig 7, prawy panel) [36] podczas gdy archeony posiadają heptamer uL10-(P1-P1)₃ [37] będący homologiem układu eukariotycznego (Fig. 7, środkowy panel). Pod względem ewolucyjnym białka P1/P2 i bL12 stanowią układy analogicznie, a nie homologiczne. Postuluje się, że ich pojawienie się jest wynikiem ewolucji konwergentnej [38].

Interesującym jest zjawisko dalszego różnicowania się białek P u niższych eukariotów, jak drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, u których białka P wyewoluowały aż do czterech różnych białek oznaczonych symbolami: P1A, P1B, P2A i P2B [39]. U drożdży białka P preferencyjnie tworzą dwa specyficzne hetero-dimery, P1A-P2B i P1B-P2A, które na rybosomie występują w formie kompleksu tworząc wraz z białkiem uL10 pentamer uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A) [11, 40, 41, 42, 43].

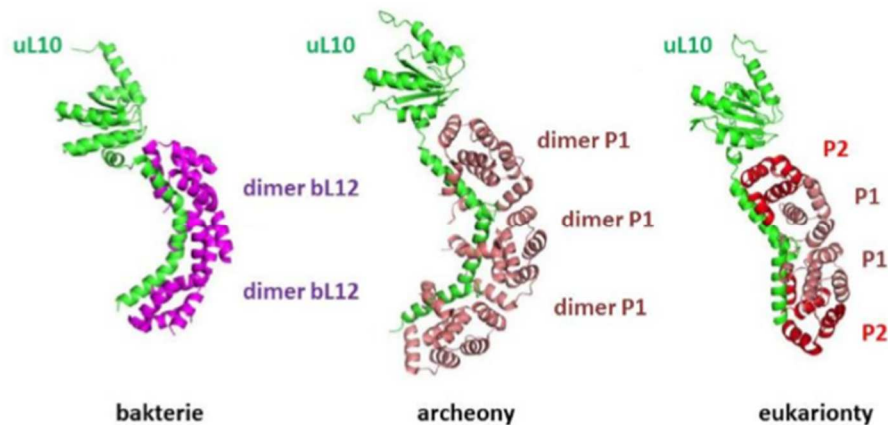


Fig. 7. Model struktury kompleksu białek tworzących boczną wyniosłość rybosomalną [44]. Panel lewy: model struktury kompleksu białek uL10-(bL12)₄ u bakterii na przykładzie *E. coli*. Panel środkowy: struktura kompleksu białek uL10-(P1)₆ u archeonów na przykładzie *P. horikoshii*. Panel prawy: proponowana struktura kompleksu białek uL10-(P1-P2)₂ u eukariontów na przykładzie *H. sapiens*

Masa molekularna białek P1/P2 u niższych *Eukaryota* wynosi ok. 11 kDa, m. in. u *S. cerevisiae* [45, 46] lub ponad 12 kDa u wyższych *Eukaryota* [22]. W odróżnieniu od większości tzw. zasadowych białek rybosomalnych, są one białkami kwaśnymi i charakteryzują się punktem izoelektrycznym, ok 4 [21, 47]. W strukturze białek P możemy wyróżnić trzy regiony/domeny. Pierwszy, to N-terminalna (NTD, ang. „*N-terminal domain*”) globularna domena zbudowana z około 60 reszt aminokwasowych, odpowiedzialna za formowanie się hetero-dimerów P1-P2 [11] oraz zakotwiczenie ich na rybosomie, za pośrednictwem uL10. Drugi region, to C-terminalna (CTD, ang. „*C-terminal domain*”) konserwatywna sekwencja składająca się z około 20 reszt aminokwasowych [47], występująca we wszystkich eukariotycznych białkach P, zaangażowana w interakcje z czynnikami translacyjnymi. W obrębie tego regionu znajdują się jedna (u drożdży) lub dwie (u ssaków) ewolucyjnie konserwowana reszta seryny będąca miejscem fosforylacji tych białek katalizowanej przez kinazę białkową CK2. Z tych też względów nazywa się je białkami P (ang. „*phosphorylated*”) [48]. Trzecim, charakterystycznym regionem białek P1/P2 jest region między NTD a CTD, zwany regionem zawiasowym; region ten jest bogaty

w reszty alaniny, glicyny i proliny, który łączy obie domeny i nadaje całej strukturze dużą elastyczność [47].

Organizacja przestrzenna eukariotycznych białek P1/P2, pomimo podobnych funkcji, różni się znacznie od ich prokariotycznego odpowiednika bL12. Wczesne analizy z wykorzystaniem metody SAXS wykazały, że dimer P1A-P2B, ma wydłużony kształt o maksymalnej długości ~10 nm i przekroju ~2,5 nm (Fig. 8) [49]. Ponadto, pomiary relaksacji ^{15}N NMR udowodniły, że około 30% reszt aminokwasowych występuje w bardzo elastycznych segmentach, które należą głównie do regionu zawiasowego oraz C-końcowej części łańcucha polipeptydowego [49, 50, 51, 52].

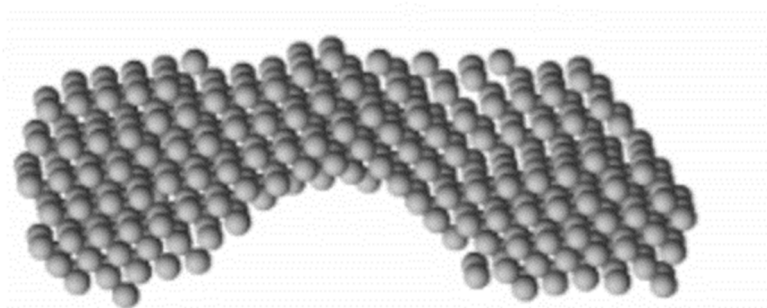


Fig. 8. Model struktury 3D drożdżowego hetero-dimeru P1A-P2B opracowana metodą SAXS [49]. Model opracowano na podstawie analizy SAXS, wykorzystując hetero-dimer P1A-P2B otrzymany z użyciem rekombinowanych białek P1A i P1B.

Kolejne badania strukturalne z wykorzystaniem metody NMR przyniosły dalszy wgląd w strukturę białek P1 i P2 pokazując, że domena NTD cechuje się obecnością czterech alfa-helis, w których helisy 1, 2 i 4 są zwrócone ku sobie, podczas gdy helisy 3 zarówno NTD-P1, jak i NTD-P2 są ułożone po przeciwnych stronach struktury i nie są zaangażowane w ich w dimeryzację (Fig. 9A) [51, 52]. C-terminalny fragment, wraz z elementem zawiasowym wykazuje się dużą elastycznością. Analiza NMR wskazała, że fragmenty te nie posiada określonej struktury przestrzennej (Fig. 9B) a tworzą wydłużony fragment polipeptydowy. Jednakże, C-terminalny fragment w zakresie 20 reszt aminokwasowych posiada zdolność do formowania α -helisy w przypadku gdy ulega interakcji z trGTPazami [53].

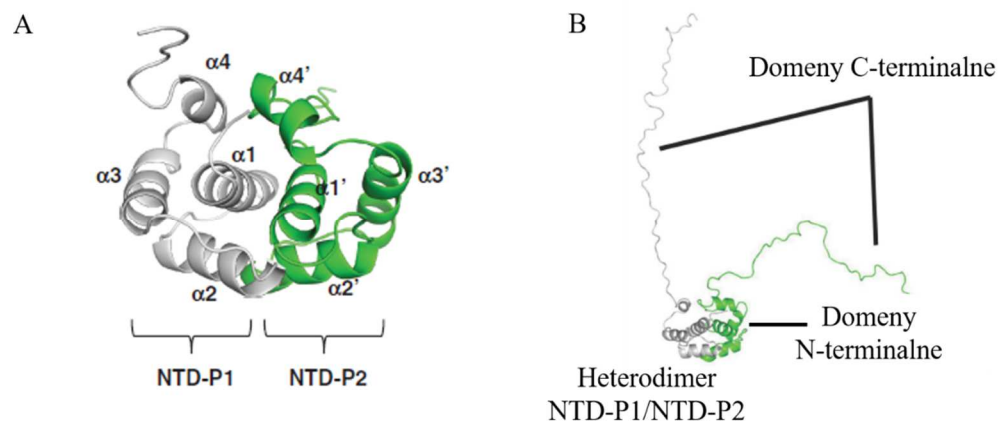


Fig. 9. Model struktury hetero-dimeru białek P1-P2 opracowana za pomocą spektroskopii NMR [51, 52].

A: Struktura fragmentów NTD-P1/NTD-P2, do analizy wykorzystano rekombinowane białka ludzkie. NTD-P1 (szary) i NTD-P2 (zielony) zawierają po cztery α helisy. B: model strukturalny pełnego hetero-dimeru P1-P2, z zaznaczonymi poszczególnymi domenami.

Białko uL10 wraz z białkiem uL11 stanowią tzw. podstawę „kciuka” rybosomalnego, tworząc rusztowanie dla pozostałych białek wchodzących w skład rybosomalnego centrum GAC tj. dimerów bL12-bL12 (*Bacteria*) [20, 54], P1-P1 (*Archaea*) [55] czy P1-P2 (*Eucaryota*) [11, 41, 56]. Białko uL10 wykazuje charakterystyczną i wysoce konserwatywną strukturę w grupie białek rybosomalnych, ale ze specyficznymi cechami występującymi tylko u *Eukaryota*. Jego N-terminalna domena wiążąca rRNA (RBD, z ang. *rRNA binding domain*), o długości około 120 aminokwasów, odpowiedzialna jest za wiązanie się uL10 do rybosomu [57, 58]. Domena NTD białka uL10 u eukariontów wykazuje wysoki stopień podobieństwa, pod względem zarówno sekwencji aminokwasowej jak i struktury przestrzennej, do domeny NTD prokariotów i archeonów [57, 58, 59]. C-terminalna domena białka uL10 stanowi ewolucyjnie odrębną, specyficzną dla danej domeny życia strukturę, jednakże jest to pojedyncza α -helisa będąca zakotwiczeniem dla bakteryjnych białek bL12, czy eukariotycznych białek P (Fig. 7) [60]. I tak, eukariotyczny C-terminalny fragment, zwany także domeną P, zawiera dwa specyficzne α -helikalne regiony będące miejscami wiązania poszczególnych dimerów P1-P2 [34, 61]. U drożdży *S. cerevisiae* te dwa krótkie regiony obejmujące reszty aminokwasowe 199-230 oraz 231-258 białka uL10 odpowiedzialne są za niezależne wiązanie dimerów P1A-P2B oraz P1B-P2A [62]. Ponadto wykazano, że białka P1/P2 są białkami opiekuńczymi w stosunku do białka uL10

warunkującymi uzyskanie przez uL10, prawidłowej struktury przestrzennej [62]. Domena P, poza dwiema α -helisami posiada 20 aminokwasowy fragment homologiczny do elementu zawiasowego oraz C-terminalny element zawierający około 20 reszt aminokwasowych wykazujących wysoką homologię do analogicznego elementu w białkach P1/P2 [60]. W konsekwencji, rybosomalny „kciuk” zawiera pięć strukturalnie identycznych elementów polipetydowych. Pomimo zaawansowanego rozwoju technik badawczych w zakresie biologii molekularnej i strukturalnej nie udało się opracować pełnej struktury eukariotycznego „kciuka” rybosomalnego [63]. Obecne hipotetyczne modele oparte są na fragmentarycznych danych strukturalnych, które dają jedynie ogólne wyobrażenie tej struktury. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest duża dynamika „kciuka” rybosomalnego, wynikająca z nieustrukturalizowania białek P [51, 52].

Eukariotyczne białko uL11 jest jednym z najbardziej konserwowanym białkiem rybosomalnym w obrębie wszystkich domen życia [5, 64]. Jest ono zakotwiczone do pętli tiostreptonowej przez C-terminalną domenę wiążącą rRNA. Jego N-terminalna domena współdziała z białkami „kciuka” w zakresie wiązania i stymulacji czynników translacyjnych [65, 66, 67, 68]. Obie domeny białka uL11 połączone są elastycznym łącznikiem zapewniającym jego poprawne funkcjonowanie i możliwość przestrzennej rearanżacji. Wykazano, że białko uL11 pełni istotną rolę działając jak molekularny przełącznik monitorujący i sterujący rybosomem, umożliwiając cykliczne oddziaływania trGTPaz z rybosomem [65, 67]. Ponadto, białko uL11 jest ważnym elementem we wszystkich aspektach tzw. „życia rybosomu”. Począwszy od udziału w późnych etapach biogenezy podjednostki 60S i uwalnianiu czynnika Tif6 (ang. „*Translation Initiation Factor 6*”), przyczyniając się do łączenia podjednostek rybosomalnych na etapie inicjacji procesu translacji, po zaangażowanie w tzw. „aktywne życie” rybosomu w ramach cyklu translacyjnego [68].

2. ROLA CENTRUM GTPAZOWEGO W PROCESIE TRANSLACJI

Rybosom jako „makromolekularna maszyna” z udziałem mRNA, tRNA oraz białkowych czynników translacyjnych bierze udział w kluczowym procesie dla funkcjonowania komórki jakim jest biosynteza białka. Głównym motorem napędowym wszystkich etapów w cyklu translacyjnym tj. inicjacji, elongacji, terminacji i recyklingu jest energia pozyskiwana z hydrolizy GTP i uwalniana za pośrednictwem czynników translacyjnych o aktywności GTPaz, jak przedstawiono to na przykładowym schemacie procesu translacji u organizmów bakteryjnych (Fig. 10) [7].

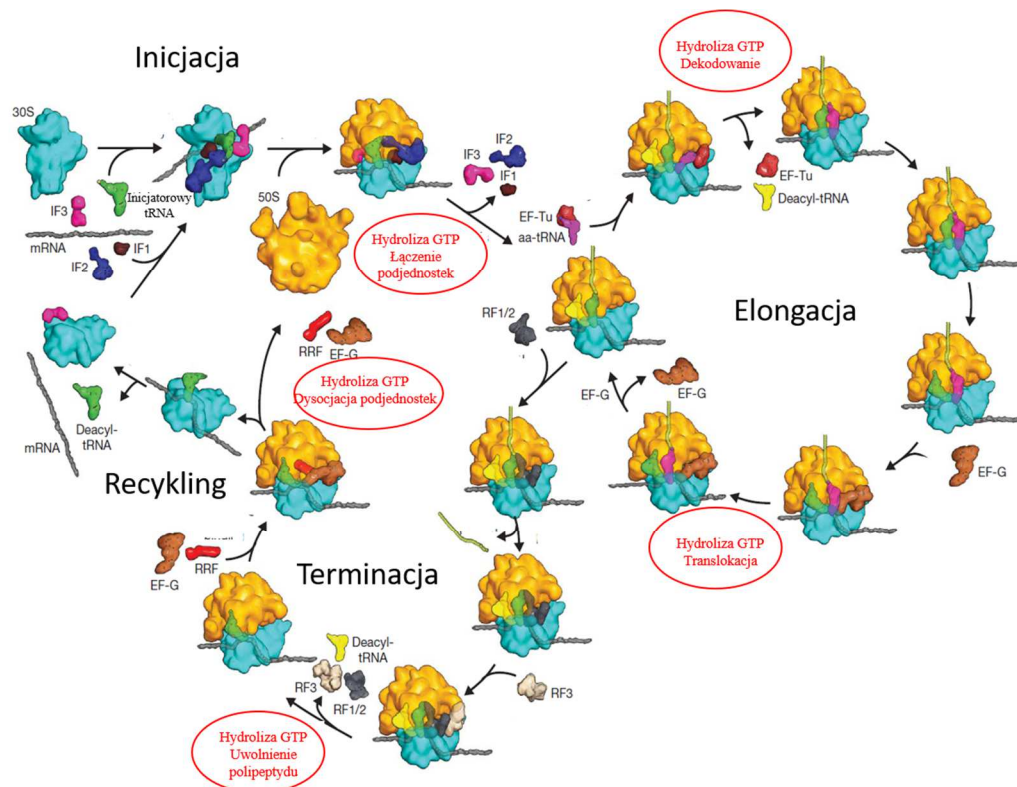


Fig. 10. Schemat procesu translacji na przykładzie organizmów bakteryjnych [7]. Kolorem niebieskim zaznaczono małą podjednostkę rybosomu – 30S, żółtym dużą podjednostkę rybosomu – 50S. Udział poszczególnych elementów w procesie translacji oznaczono zgodnie z ich zaangażowaniem w poszczególnych etapach cyklu translacyjnego. Opisy tzw. „punkty kontrolne” w których następuje hydroliza GTP zaznaczono w postaci owalnych figur .

Poszczególne, zależne od trGTPaz, etapy biosyntezy białka, stanowią zasadnicze „punkty kontrolne”, przekroczenie których determinuje i jednocześnie umożliwia przejście rybosomu do następnego etapu w cyklu translacyjnym,

co pozwala na osiągnięcie optymalnej szybkości i jednocześnie wierności tłumaczenia informacji genetycznej zakodowanej w mRNA [17]. U bakterii, będący trGTPazą czynnik inicjacyjny 2 (IF2) rekrutuje inicjatorowy fMet-tRNA^{fMet} do miejsca P małej podjednostki rybosomalnej podczas etapu inicjacji procesu translacji, tym samym kontrolując wybór poprawnej ramki odczytu. Zachodząca hydroliza GTP jest „punktem kontrolnym”, kończącym proces inicjacji umożliwiającym uformowanie się translacyjnie kompetentnego rybosomu i jednocześnie uwolnienie wszystkich czynników inicjacyjnych (Fig. 10) [4, 69].

Etap elongacji syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego obejmuje trzy powtarzające się elementy: selekcję aa-tRNA i jednocześnie dekodowanie informacji genetycznej, formowanie wiązania peptydowego oraz translokację rybosomu o jeden kodon na mRNA. Proces ten realizowany jest u bakterii przy udziale dwóch trGTPaz: elongacyjnego czynnika EF-Tu i EF-G (Fig. 10) [7, 12]. EF-Tu odpowiedzialny jest za dostarczanie aa-tRNA do miejsca A rybosomu w postaci tzw. potrójnego kompleksu EF-Tu-aa-tRNA-GTP. Prawidłowe oddziaływanie kodon-antykodon indukuje zmiany konformacyjne rybosomu, w formie tzw. weryfikacji strukturalnej tych oddziaływań. Informacja ta jest przenoszona aż do centrum GAC indukując tym samym hydrolizę GTP i uwolnienie EF-Tu. Zjawisko to jest „punktem kontrolnym” warunkującym późniejsze utworzenie wiązania peptydowego. Po utworzeniu tegoż wiązania peptydowego, EF-G - trGTPaza katalizuje ostatni etap elongacji – translokację, podczas której następuje przemieszczenie nowo utworzonego peptydylo-tRNA z miejsca A do miejsca P, wolnego tRNA z miejsca P do miejsca E, przy jednoczesnym przesunięciu rybosomu o jeden kodon mRNA. Hydroliza GTP katalizowana przez EF-G i stymulowana przez GAC, to przykład typowej konwersji energii zgromadzonej w GTP na energię mechaniczną, która jest „punktem kontrolnym” napędzającym proces translokacji. W wyniku tego procesu rybosom posiada wolne miejsce A, wykazując gotowość do następnego cyklu elongacyjnego. Nowo zsyntetyzowany łańcuch polipeptydowy zostaje uwolniony z maszynierii translacyjnej w etapie terminacji, który zaczyna się w momencie pojawienia się jednego z trzech kodonów tzw. „stop” w miejscu A. Proces ten, u bakterii, przebiega przy udziale dwóch klas terminacyjnych czynników białkowych. Klasę I stanowią bakteryjne czynniki terminacyjne RF1 i RF2, które są odpowiedzialne za rozpoznawanie kodonów „stop” oraz hydrolizę wiązania estrowego w peptydylo-tRNA, co w konsekwencji prowadzi do uwolnienia białka

z rybosomu. Klasę II stanowi czynnik RF3 należący do trGTPaz, którego rolą jest zakończenie etapu terminacji i uwolnienie czynników RF1/2. Zachodząca hydroliza GTP jest elementem zapewniającym zmiany strukturalne warunkujące dysocjację RF3 z rybosomu. Wreszcie, podczas ostatniej fazy, tzw. recyklingu podjednostek rybosomalnych, czynnik RRF (ang. „*ribosome release factor*”) wspomagany przez EF-G dostarczając energii uwalnianej w wyniku hydrolizy, umożliwia rozpad rybosomu 70S na poszczególne podjednostki. Mogą one ponownie być zaangażowane w nową rundę cyklu translacyjnego (Fig. 10). Należy podkreślić, że zjawisko hydrolizy GTP za pośrednictwem trGTPaz, jak również czynny udział centrum GAC jest zjawiskiem konserwatywnym. Bakteryjne trGTPazy: IF2, EF-Tu, EF-G i RF3 mają swoje odpowiednie pod względem funkcji, homologiczne czynniki w organizmach eukariotycznych, odpowiednio, eIF5B, eEF1A, eEF2 i eRF3 [69]. Należy dodać, że proces inicjacji u bakterii i eukariontów przebiega w nieco odmienny sposób [70]. Inicjatorowy eukariotyczny tRNA-Met dostarczany jest do rybosomu przez specyficzny dla eukariontów eIF2, jednakże końcowy etap formowania aktywnie translacyjnego rybosomu odbywa się za pośrednictwem czynnika eIF5B, który jest homologiem bakteryjnego IF2 [7, 19].

Pod względem funkcjonalnym trGTP-azy pełnią rolę molekularnych „przełączników”. Ich struktura przestrzenna, a tym samym i funkcja, oscyluje między dwoma stanami konformacyjnymi: aktywnym, kiedy czynnik ten związany jest z GTP oraz nieaktywnym, gdy czynnik po hydrolizie GTP i po odłączeniu reszty fosforanowej, związany jest z GDP. Wszystkie trGTPazy są białkami wielodomenowymi, w skład których wchodzi domena wiążąca GTP (domena G) oraz jedna lub kilka dodatkowych domen unikalnych dla danego czynnika translacyjnego [4]. Architektura domeny G, jest konserwatywna we wszystkich translacyjnych GTPazach poczynając od bakterii aż do wyższych eukariontów [4, 19]. W obrębie domeny G wyróżniamy pięć charakterystycznych motywów. Pierwszy, G1 zwany również pętlą-P, tworzy wiązania z grupami fosforanowymi należącymi do GTP. Motywy G2 („Switch1”) i G3 („Switch2”), zawierające elastyczne regiony odpowiedzialne są za interakcje z GTP bądź GDP i jonami magnezu. Ostatnie dwa motywy G4 i G5 umożliwiają poprawną selekcję przyłączanych nukleotydów (Fig. 11).

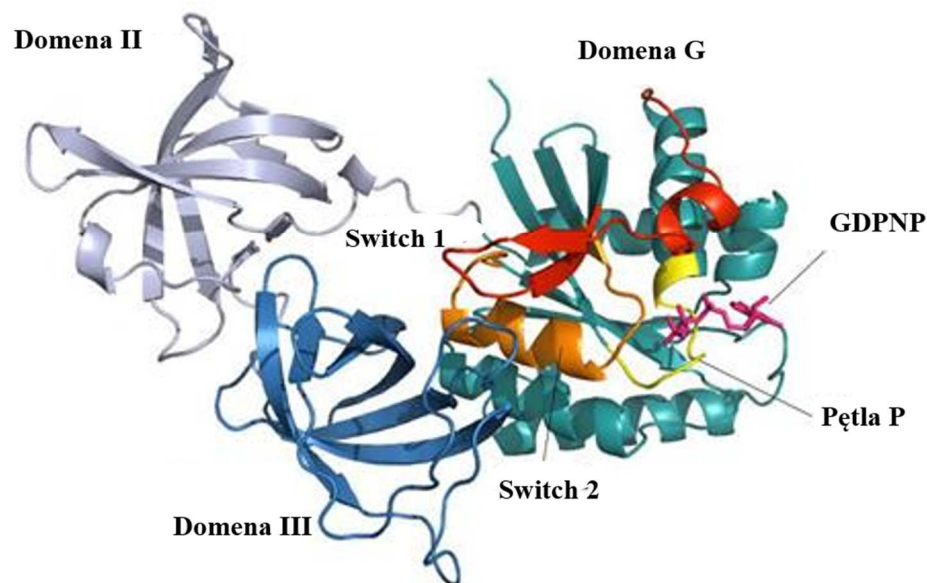


Fig. 11. Struktura bakteryjnej trGTPazy (czynn timer elongacyjny EF-Tu) [71]. W obrębie domeny G (turkus) zaznaczono kolorem czerwonym „Switch 1”, pomarańczowym „Switch 2”, żółtym pętlę P, domeny II i III zaznaczono odpowiednio kolorem szarym i niebieskim, pozycja GTP (niehydrolizowalny analog GDPNP) zaznaczono kolorem fioletowym.

Specyficznym miejscem na rybosomie, odpowiedzialnym za wiązanie i stymulację czynników translacyjnych jest centrum GTPazowe znajdujące się w obrębie dużej podjednostki rybosomu [4, 20]. Badając rybosom bakteryjny w kompleksie z trGTPazami, np. z EF-G, wskazano że podczas interakcji rybosomu (centrum GAC) z trGTPazami tworzy się charakterystyczne połączenie zwane „*Arc-like connection*” (ALC), między domeną G trGTPazy, N-końcem polipeptydu uL11 oraz C-terminalną domeną białka bL12 (CTD). Sugeruje się, że zarówno czynnik elongacyjny EF-G, jak i rybosomalne centrum GTPazowe ulegają znacznym zmianom konformacyjnym, tworząc połączenie ALC [7, 72, 73]. Wykazano, że w obecności czynnika EF-G, C-terminalny koniec białka uL10 ulega odchyleniu w kierunku regionu uL11 a to z kolei prowadzi do oddziaływania fragmentu CTD bL12 zarówno z NTD uL11, jak i domeną G (jej elementem zwanym G') czynnika elongacyjnego EF-G (Fig. 12). Integracja danych strukturalnych i biochemicznych sugeruje, że zachodzące w obrębie domeny G' EF-G, zmiany konformacyjne prowadzą nie tylko do stymulacji hydrolizy GTP, ale także do równie ważnego procesu, jakim jest uwolnienie wolnej grupy fosforanowej powstałej po hydrolizie

GTP. Jest to zasadniczy element do stymulacji przejścia EF-G z konformacji aktywnej do nieaktywnej, a tym samym do zmian strukturalnych będących głównym motorem translokacji [73, 74, 75]. Obecnie, brak jest danych obrazujących podobne zjawisko u *Eukaryota*. Jednakże z racji na bardzo wysoki stopień homologii wśród wszystkich trGTPaz oraz zasadniczych elementów GAC, można przypuszczać, że mechanizm aktywacji hydrolizy GTP może być podobny.

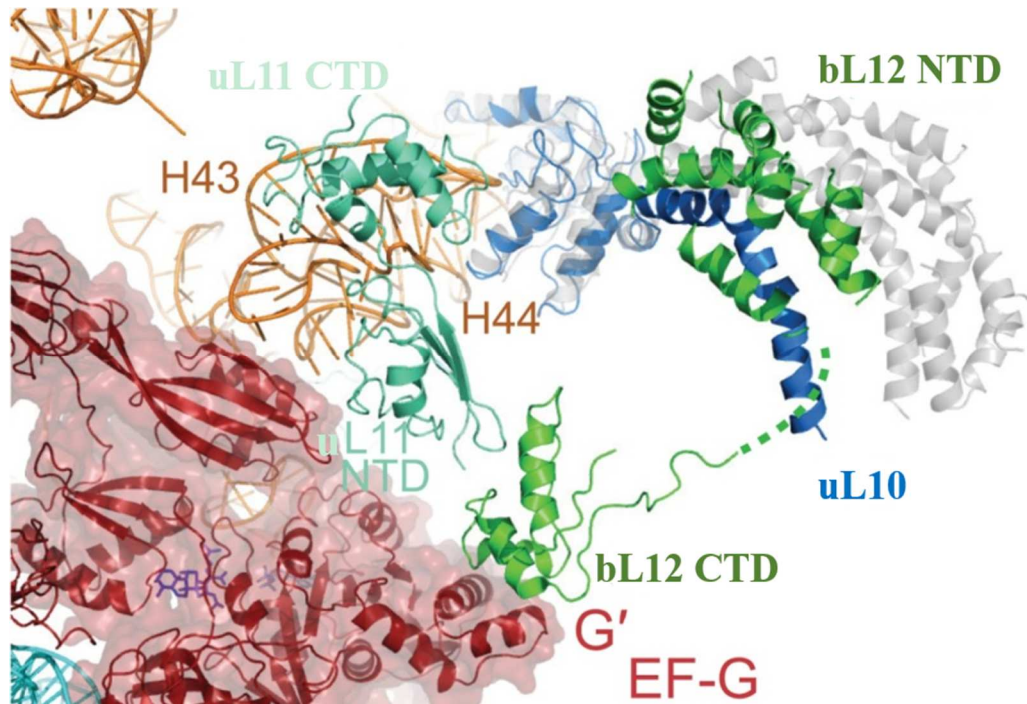


Fig. 12. Interakcja czynnika EF-G z centrum GTPazowym w obrębie białek uL11, uL10 i bL12 [73]. Model strukturalny przedstawia oddziaływanie domeny G EF-G z fragmentem NTD uL11. Białka „kciuka” uL10 i bL12 wygięte są w kierunku białka uL11. Fragment CTD bL12 tworzy połączenie z domeną G' EF-G, oraz z NTD bL12.

Spontaniczna aktywność translacyjna, związana z hydrolizą, trGTPazy jest bardzo niska, natomiast radykalnie zwiększa się po związaniu czynnika translacyjnego z rybosomem. Wykazano, że do pełnej aktywacji poszczególnych trGTPaz wymagana jest konkretna konformacja przestrzenna rybosomu. I tak, na przykład, maksymalna stymulacja hydrolizy GTP przez EF-Tu zachodzi w wyniku poprawnego parowania kodon-anty kodon w rybosomalnym miejscu A, a wydajność hydrolizy GTP zwiększana jest o około 6 rzędów wielkości [19]. trGTPaza EF-G wiąże się do rybosomu po utworzeniu wiązania peptydowego kiedy to cząsteczki tRNA występują na rybosomie w tzw. stanie hybrydowym A/P i P/E,

a podjednostki rybosomalne ulegają przesunięciu względem siebie (ang. „*ratcheted state*”) [76]. Zatem, specyficzna konfiguracja strukturalna rybosomu jest elementem sprawczym pozwalającym na asocjację konkretnej trGTPazy w określonym czasie i na określonym etapie funkcjonowania rybosomu a centrum GTPazowe stymuluje czynnik translacyjny do hydrolizy GTP, tylko gdy jest on w odpowiedniej konfiguracji strukturalnej na rybosomie.

Wykazano, że zarówno u bakterii jak i eukariota usunięcie białek „kciuka” rybosomalnego, bL12 czy P1-P2, upośledza wiązanie czynników translacyjnych oraz aktywność trGTPaz, co w konsekwencji upośledza proces translacji [77, 78]. W ujęciu kinetycznym wykazano, że brak białek rybosomalnych wyniosłości bocznej w znacznym stopniu zmniejsza szybkość katalizowanej przez EF-G hydrolizy GTP, ponad 4000-krotnie. Równie silną zależność wydajności hydrolizy GTP, od obecności białek „kciuka”, odnotowano dla EF-Tu, (brak białek bL12 obniża wydajność hydrolizy 2500-krotnie) [79]. Brak białek bL12 na rybosomie bakteryjnym oznacza brak miejsc oddziałujących z trGTPazami w obrębie „kciuka” i przynosi efekt letalny dla komórki. W przypadku rybosomu eukariotycznego, brak białek P1/P2 zaburza funkcjonowanie maszynerii translacyjnej, jednakże nie jest to letalne dla komórek [33, 77, 78]. Fakt ten, znacząco odróżnia rolę architektury „kciuka” eukariotycznego od bakteryjnego. Różnica ta dotyczy rybosomalnego białka uL10, które zawiera unikalną dla eukariontów domenę P, wykazującą wysoką homologię do białek P1/P2. Domena ta stanowi minimalny element „kciuka” rybosomalnego, zapewniający wystarczający poziom wiązania trGTPaz i stymulacji hydrolizy GTP [77]. Zatem, usunięcie pełnego pentamerycznego kompleksu z rybosomu eukariotycznego, włączając w to białko uL10, lub usunięcie białek P1/P2 oraz domeny P z białka uL10 prowadzi do pełnego upośledzenia działania rybosomu [33, 77, 80]. Bezspornym jest zatem fakt, że białka bL12 czy P1/P2, są czynnikami niezbędnymi do pełnej stymulacji hydrolizy GTP przez trGTPazy, jak i w konsekwencji do prawidłowego funkcjonowania rybosomu [77, 79]. Ponadto, należy podkreślić, że zarówno rybosomalne centrum GTPazowe z jego elementem białkowym jak i same trGTPazy wykazują wysoki stopień strukturalnego i funkcjonalnego podobieństwa. Zatem, mechanizm aktywacji hydrolizy GTP wydaje się być wspólny dla poszczególnych domen życia, jednakże brak jest wiedzy na poziomie molekularnym jak dokładnie funkcjonują białka „kciuka” rybosomalnego, przede wszystkim białka P1/P2 w kontekście stymulacji trGTPaz.

Należy podkreślić, że pomimo wykazania istotnej roli eukariotycznych białek P w oddziaływaniu z czynnikami translacyjnymi eIF5B, eEF1A czy eEF2, a tym samym w całym procesie translacji [45, 50, 81, 82], ich rola oraz dokładny mechanizm funkcjonowania są nadal nie w pełni poznane. Wykorzystując szereg analiz biochemicznych, jak i strukturalnych [83, 84, 53, 60, 85] udowodniono, że translacyjne GTPazy wiążą się bezpośrednio z konserwowanym C-końcowym fragmentem białek P, włączając także C-terminalny element eukariotycznego białka uL10. Za wiązanie z czynnikami translacyjnymi odpowiedzialne są hydrofobowe reszty aminokwasowe fragmentu CTD, w tym wysoce konserwowane reszty Leu106 i Phe107 [86].

Drugim kluczowym elementem centrum GAC w aktywacji hydrolizy GTP jest pętla sarcynowo-rycynowa (SRL), należąca do elementu rRNA. Rola SRL została dobrze opisana w aspekcie udziału tej struktury w stymulacji hydrolizy GTP. Mechanizm hydrolizy GTP katalizowanej przez translacyjne GTPazy zakłada działanie katalitycznej reszty histydyny His84 (w EF-Tu) w obrębie domeny G trGTPaz, która warunkuje prawidłowe pozycjonowanie cząsteczki wody w stosunku do γ -fosforanu w GTP, związanego z pętlą P domeny G (Fig. 13). Uważa się, że przedwczesnej hydrolizie GTP przez trGTPazę, jak na przykład EF-Tu, zapobiega układ strukturalny, tzw. „bramka hydrofobowa”, która zbudowana jest z dwóch reszt aminokwasów hydrofobowych (Ile60 i Val20). Otwarcie „bramki hydrofobowej” jest niezbędne do inicjacji hydrolizy GTP za pośrednictwem His84. Zatem, wiązanie się trGTPazy do rybosomu w odpowiedniej konformacji prowadzi do aktywacji czynnika translacyjnego poprzez otwarcie „bramki hydrofobowej”. Pętla sarcynowo-rycynowa umożliwia otwarcie tejże „bramki” oraz indukuje zmianę konformacji przestrzennej katalitycznej reszty histydyny co w konsekwencji prowadzi do aktywacji cząsteczki wody a ta z kolei indukuje hydrolizę γ -fosforanu w cząsteczce GTP (Fig. 13) [19, 87].

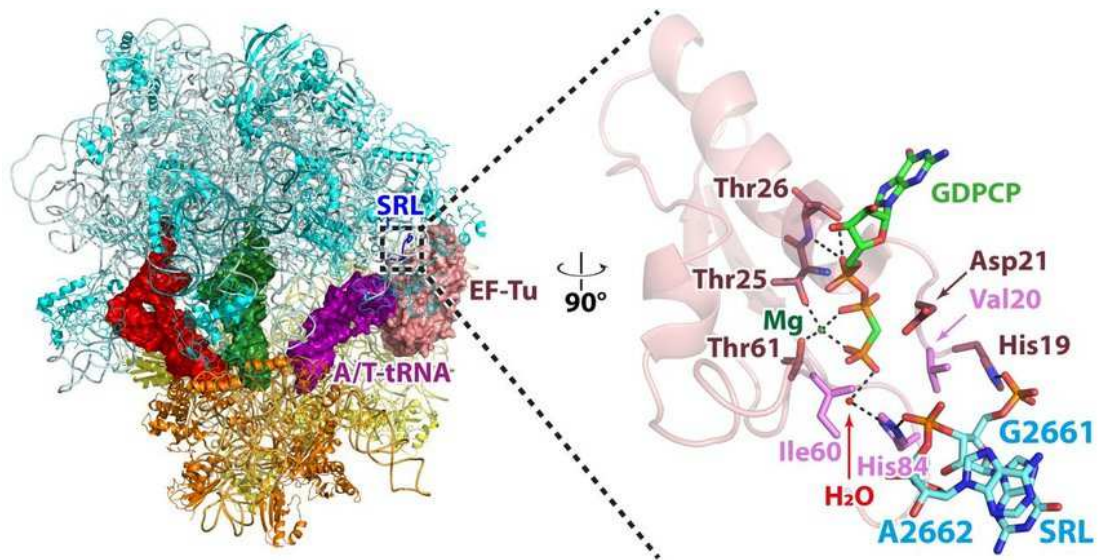


Fig. 13. Model strukturalny oddziaływania rybosomu z EF-Tu podczas hydrolizy GTP [praca doktorska John-Philipp Achenbach z Technischen Universität Berlin]. Lewy panel: Rybosom 70S ze związanym trójskładnikowym kompleksem. Kolorami zaznaczono funkcjonalne miejsca A (fioletowy), P (zielony), E (czerwony). Prawy panel, fragment EF-Tu w kompleksie z GTP (niehydrolizowalny analog GDPCP). Wiązania wodorowe zaznaczono liniami przerywanymi. Na modelu struktury zaznaczono jon magnezowy (ciemno zielona kropka) koordynujący wiązania wodorowe między Thr25, Thr61 i β - i γ -fosforanem GTP. Hydrofobowa bramka (Val20 i Ile60) oznaczona jest kolorem jasny fiolet. Orientacja His19, sąsiadująca z Val20, jest stabilizowana przez wiązanie wodorowe z nukleotydem G2661 23S rRNA SRL. Grupa fosforanowa wchodząca w skład nukleotydu A2662 stabilizuje aktywną konformację His84, która aktywuje cząsteczkę wody (kolor jasno fioletowy); czerwona kropka, cząsteczka wody grająca kluczową rolę w katalizie hydrolizy wiązania estrowego między γ i β grupami fosforanowymi.

2.1. Regulacja aktywności centrum GTPazowego a białka P

Centrum GTPazowe, będące częścią dużej podjednostki rybosomalnej, jest kluczowym elementem rybosomu odpowiedzialnym za stymulację hydrolizy GTP przez translacyjne GTPazy, na wszystkich etapach syntezy białek [7, 88, 89]. GAC wraz trGTPazami przekształca energię chemiczną zmagazynowaną w GTP w energię „mechaniczną”, która umożliwia rybosomowi efektywną realizację wszystkich zadań, zapewniając szybkość i dokładność procesu translacji [19, 86]. Eukariotyczne białka P, podobnie jak ich prokariotyczny odpowiednik bL12, stanowią zasadniczy element białkowy centrum GTPazowego, jednakże należy podkreślić, że te dwie grupy białek są homologami funkcjonalnymi, ale nie są strukturalnie spokrewnione [38]. Pomimo wieloletnich badań nad strukturą i funkcją tych białek, ich rola jest nadal nie do końca wyjaśniona. Pierwszą i zarazem jedną z najbardziej enigmatycznych cech jest zjawisko fosforylacji w obrębie C-końcowej części polipeptydu [48]. Analizując wysoce konserwatywny motyw obecny w C-terminalnym fragmencie białek P (włączając w to białko uL10), fragment ten zawiera odcinek silnie kwaśnych i hydrofobowych reszt aminokwasowych (EEEAKEE**S**DDDMGFGLFD). W jego obrębie znajduje się jedna (drożdże) lub dwie (ssaki) specyficzne reszty seryny (Ser) występujące w specyficznym konsensusie rozpoznawanym przez kinazę CK2 (Fig. 14) [48, 90]. Obecność tej specyficznej modyfikacji reszty seryny została wykazana w licznych analizach biochemicznych jak i obecnie w wysoko-przepustowych badaniach proteomicznych [48, 90, 91], jednakże rola tej modyfikacji nie jest znana. Jako że ta C-terminalna domena jest bezpośrednio zaangażowana w wiązanie czynników translacyjnych do rybosomu postuluje się, że fosforylacja w obrębie tego fragmentu może zmieniać profil oddziaływania rybosomu z trGTPazami, tym samym zmieniając parametry ilościowo/jakościowe translacji. W konsekwencji, modyfikacja C-końca białek P może dostosować maszynę translacyjną do wymagań metabolicznych komórki w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe [92].

P1	
<i>Homo sapiens</i>	KKEE S EE S DDDMGFGLFD
<i>Rattus norvegicus</i>	KKEE S EE S EDDMGFGLFD
<i>Gallus gallus</i>	KKEE S EE S DDDMGFGLFD
<i>Danio rerio</i>	KKEE S EE S DDDMGFGLFD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> A	EEEAKKEE S DDDMGFGLFD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> B	EEEEAAEE S DDDMGFGLFD
<i>Drosophila melanogaster</i>	KEEE S DQ S DDDMGFGLFD
<i>Plasmodium falciparum</i>	EKVEEEEEEDDLGF S LF
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KEEEKEE S DEDMGFGLFD
P2	
<i>Homo sapiens</i>	KKEE S EE S DDDMGFGLFD
<i>Rattus norvegicus</i>	KKEE S EE S DDDMGFGLFD
<i>Gallus gallus</i>	KKEE S EE S DDDMGFGLFD
<i>Danio rerio</i>	KKEE S EE S DEDMGFGLFD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> A	EEEAKKEE S DDDMGFGLFD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> B	EEEEAAEE S DDDMGFGLFD
<i>Drosophila melanogaster</i>	KKEE S E S EDDMGFALFE
<i>Plasmodium falciparum</i>	KKEEEEEEDDLGF S LF
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KEEEKEE S DEDMGFGLFD

Fig. 14. Zestawienie sekwencji aminokwasowej w C-terminalnym fragmencie białek P1/P2 u eukariontów [38]. Kolorem niebieskim zaznaczono resztę seryny ulegającą modyfikacji post-translacyjnej, fosforylacji.

Sugeruje się, że u drożdży *S. cerevisiae* fosforylacja białek P może wpływać na formowanie się i stabilność kompleksu tych białek [40]. Wykazano, że fosforylacja białka P1A przez kinazę CK2 obniża stabilność hetero-kompleksów P1A-P2B [40]. Ze względu na to, że dimer P1A-P2B jest niezbędny do prawidłowego fałdowania białka uL10 i uzyskiwania przez nie stabilnej struktury, fosforylacja może mieć wpływ na formowanie się kompleksu pentamerycznego a tym samym może wpływać na funkcjonowanie rybosomu [93]. Na uwagę zasługuje także fakt, że eukariotyczny „kciuk” rybosomalny jest strukturą dynamiczną, nie tylko pod względem ruchliwości białek P związanej z nieustrukturalizowanym C-terminalnym fragmentem, ale co ciekawe białka P należą do unikalnej grupy białek rybosomalnych, które ulegają wymianie między rybosomem a pulą wolnych cytoplazmatycznych białek P [94,95,96]. Postuluje się, że wymiana ta może powodować cykliczne zmiany konformacji/stechiometrii „kciuka” rybosomalnego. Należy podkreślić, że oddziaływanie hetero-dimerów

P1/P2 ma miejsce w specyficznych, blisko sąsiadujących ze sobą miejscach w białku uL10. W przypadku białka uL10 z komórek *S. cerevisiae* występują dwa niezależne miejsce wiązania: dla hetero-dimeru P1A-P2B znajduje się między aminokwasami 199-230, zaś dimer P1B-P2A wiąże się z miejscem leżącym między aminokwasami 231-258 [62]. Zatem, można postulować że mechanizm formowania rybosomalnej wyniosłości bocznej może generować zmienny poziom heterogenności „kciuka” rybosomalnego , a heterogenność ta może być istotna w regulacji aktywności translacyjnej rybosomów [62, 97]. W świetle tych informacji, istotny aspektem strukturalno/funkcjonalnym jest powielenie białek P, na rybosomie eukariotycznym. Białka te, jako jedyne występują na rybosomie w formie czterech kopii. Biorąc pod uwagę domenę P w białku uL10, która jest homologiczna do białek P, zatem na rybosomie funkcjonuje pięć identycznych elementów strukturalno-funkcjonalnych. Jednakże, pomimo wielu lat badań, nie określono roli zjawiska powielenia tych białek w aspekcie funkcjonowania rybosomu.

Ponadto, wykazano również, że białka P ulegają dodatkowym modyfikacjom, jak acetylacja czy metylacja. Acetylacja białek P przypomina zachowanie analogicznych bakteryjnych rybosomalnych białek bL12 u *E. coli*, które ulegają podobnym modyfikacjom. Jednakże, podobnie jak w przypadku fosforylacji białek wyniosłości bocznej, tak i w tym przypadku rola tych modyfikacji nie jest znana [45].

3. POZA-TRANSLACYJNE FUNKCJE BIAŁEK P

Wiele białek rybosomalnych w komórkach eukariotycznych, oprócz aktywnego zaangażowania w proces syntezy białka jako element maszynierii translacyjnej, wykazuje inne, tzw. poza-translacyjne funkcje (ang. „*extra-ribosomal-functions*”). Z tego też względu białko uL10 sklasyfikowane zostało jako tzw. białko o podwójnej aktywności (ang. „*moonlighting proteins*”) [98]. Do takich białek można także zaliczyć białka tworzące rybosomalną wyniosłość boczną. Wykazano, że białka P występują na strukturach powierzchniowych komórek. I tak, wykryto je w ścianie komórkowej drożdży [104], na powierzchni trofozoidów *Plasmodium* [99] oraz w błonie komórek ssaczych [100, 101]. Ponadto, opisana została specyficzna relokalizacja białka uL10 na membranę komórkową po indukcji apoptozy [102]. Jednakże, na dzień dzisiejszy nie powiązano tych obserwacji z konkretnym szlakiem metabolicznym i rolą tych białek w takim szlaku. Ponadto wykazano także, że w warunkach stresu jąderkowego białko uL10 uwalniane jest z rybosomu i akumulowane w cytoplazmie co może mieć istotne konsekwencje funkcjonalne [103]. Innym przykładem dodatkowych, poza-rybosomalnych funkcji białek P jest wykazana w komórkach *Drosophila melanogaster* aktywność endonukleolityczna białka uL10 [104]. Aktywność ta związana jest prawdopodobnie z procesem naprawy DNA [104, 105]. Ponadto potencjał tego białka do wiązania się do DNA może być powiązany z procesem regulacji ekspresji genów [106]. Dodatkowo, białko uL10 zostało znalezione w jądrze komórkowym, w kompleksie z białkiem wirusowym wirusa LCMV (ang. „*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*”) oraz białkiem jądrowym PML (ang. „*Promyelocytic Leukemia Protein*”) o aktywności pro-apoptotycznej [107, 108]. Białko uL10 zaangażowane jest również w interakcję z innymi partnerami białkowymi. Należy tutaj wymienić: białko Staufen 1 biorące udział w transporcie mRNA [109], białko Tau charakterystyczne dla choroby Alzheimera [110], białko KIF4 związane z transportem rybosomów w komórkach nerwowych [111], FMRP występujące najczęściej w mózgu mające zasadnicze znaczenie dla prawidłowego rozwoju poznawczego, GCIP biorące udział w kontroli nad różnicowaniem i proliferacją komórek [112, 113].

Ciekawym jest, że białko uL10 powiązano z licznymi stanami patologicznymi człowieka. Ulega ono nadekspresji w niektórych komórkach nowotworowych np. w nowotworach ginekologicznych, w raku jelita grubego czy wątroby [113, 114, 115, 116]. Ponadto uważa się, że poziom ekspresji białek P

(P1-P2 i uL10) może stanowić jeden z markerów prognostycznych w określonych podtypach nowotworów [117]. Ponadto, białka P opisane zostały także jako molekularny czynnik etiologiczny w chorobach autoimmunologicznych. Stanowią one jeden z charakterystycznych auto-antygenów w toczeniu układowym (*Systemic Lupus Erythematosus*, SLE) [118, 119, 120]. Choroba ta charakteryzuje się obecnością między innymi przeciwciał anti-P, skierowanych głównie przeciwko epitopowi zlokalizowanemu na C-terminalnej części białek P [121]. Wykazano istotny związek między mianem przeciwciał skierowanych przeciwko białkom P a nasileniem objawów ze strony obwodowego układu nerwowego u pacjentów z SLE. Zatem, białka te mogą pełnić istotną rolę w rozwoju stanów depresyjnych [122]. Przeciwciała anti-P są w tym przypadku uważane za swoiste markery zarówno choroby jak i stopnia jej zaawansowania [123, 124].

Obecność przeciwciał skierowanych przeciwko białkom P stwierdzono również w przypadku chorób wywołanych przez pierwotniaki: *Leishmania infantum* (leiszmanioza) [125], *Toxoplasma gondii* (toksoplazmoza u zwierząt, choroba odzwierzęca - zoonoza u ludzi) [126], *Trypanosoma cruzi* (choroba Chagasa) [127] oraz *Plasmodium falciparum* (malaria) [99, 128]. Przeciwciała te stanowią element naturalnie nabytej odporności przeciwko chorobom pasożytniczym. Jako że białka P zostały wykryte na zewnętrznych powłokach tych pasożytów, specyficzne przeciwciała anti-P zapobiegają rozwinięciu się pełnoobjawowej choroby, prawdopodobnie przez blokowanie poszczególnych etapów rozwoju pierwotniaków. Białka P zostały również zidentyfikowane jako jeden z alergenów w schorzeniach wywołanych przez grzyby: *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, czy *Fusarium culmorum*.

Na uwagę zasługuje również fakt, że białka P są zaangażowane w rekrutację białek inaktywujących rybosom (RIP ang. „*Ribosomal Inactivating Protein*”), takich jak rycyna, która uważana jest za jedną z najbardziej toksycznych substancji produkowanych przez rośliny [129, 130, 131, 132].

Pomimo wielu doniesień i intensywnych prac wielu grup badawczych nad strukturą i funkcją centrum GTPazowego, rola białek P, a w szczególności ich multiplikacja, w stymulacji hydrolizy GTP przez różne trGTPazy jak i ich pozarybosomalna funkcja nie jest dobrze poznana. GAC, będąc jednym z kluczowych centrów rybosomu, odpowiedzialny za prawidłowe działanie rybosomu jest strukturą dynamiczną pod względem strukturalnym jak i funkcjonalnym, co może kształtować

aktywność rybosomu, dostosowującą jego działanie do potrzeb komórki. Zatem, białka P mogą być postrzegane jako „atrakcyjny” element regulatorowy maszyneryi translacyjnej, mogący modulować aktywność rybosomu, pozwalając komórce na adaptację do warunków stresowych.

II. CEL PRACY

Niniejsza rozprawa doktorska jest kontynuacją badań prowadzonych w Zakładzie Biologii Molekularnej, dotyczących funkcjonowania maszynerii translacyjnej w komórce eukariotycznej. Zasadniczym celem badawczym jest przybliżenie funkcji pentamerycznego kompleksu białkowego uL10-(P1-P2)₂. Rybosomalny kompleks pentameryczny jest głównym elementem centrum GTPazowego, którego funkcja polega na oddziaływaniu i stymulacji aktywności GTPazowej czynników translacyjnych, dzięki czemu proces translacji przebiega wydajnie. Głównym elementem białkowym centrum GTPazowego na rybosomie eukariotycznym stanowią białka P, które w komórkach drożdżowych formują kompleks o konfiguracji, uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A). Białka P należą do unikalnej grupy białek rybosomalnych i występują w formie czterech kopii na rybosomie, których funkcja jest nieznana.

Celem rozprawy doktorskiej było przybliżenie roli eukariotycznych białek P w funkcjonowaniu rybosomu na poszczególnych etapach procesu translacji. Prace badawcze prowadzono w warunkach *in vivo* wykorzystując jako model badawczy komórki *Saccharomyces cerevisiae* posiadające zmodyfikowaną architekturę w obrębie kompleksu pentamerycznego białek P.

Istotą rozprawy jest:

- Charakterystyka fenotypowa mutantów drożdżowych zawierających zmodyfikowany kompleks białek P w celu określenia wpływu zaburzeń w obrębie centrum GTPazowego na wzrost komórek drożdżowych w zmiennych warunkach środowiskowych.
- Określenie roli białek P w funkcjonowaniu maszynerii translacyjnej w aspekcie ilościowym.
- Opisanie wpływu białek P na precyzję dekodowania informacji genetycznej w procesie translacji przez rybosom eukariotyczny.

Charakterystyka funkcji białek P a w szczególności rola ich multiplikacji w funkcjonowaniu maszynerii translacyjnej, dostarczy cennych informacji dotyczących funkcjonowania rybosomu, jako centralnego elementu odpowiedzialnego za kształtowanie proteomu w każdej żywej komórce.

III. MATERIAŁY I METODY

1. MANIPULACJE GENETYCZNE

Manipulacje genetyczne wykonywano wg standardowych procedur [133]. Transformację komórek *E. coli* prowadzono wg metody z buforem TSS [134], zaś komórek *S. cerevisiae* wg metody z octanem litu [135]. Endonukleazy, polimerazę DNA Taq i ligazę T4 oraz inne enzymy do modyfikacji DNA stosowano zgodnie z zaleceniami producenta (Fermentas).

Plazmid stosowany do ekspresji pełnej długości i skróconego (pozbawionego miejsc wiązania dla dimerów białek P1A-P2B oraz P1BP2A), genu dla białka uL10 skonstruowano w oparciu o wektor pCM190. I tak, fragment DNA kodujący gen dla uL10 amplifikowano metodą PCR przy użyciu genomowego DNA jako matrycy ze szczepu typu dzikiego, w celu uzyskania pełnej długości gen dla uL10 oraz ze szczepu uL10 Δ h1h2, co pozwoliło otrzymać skróconą formę genu dla uL10 pozbawionego miejsc wiązania dla białek P1/P2. Produkty PCR zostały wprowadzone do wektora pCM190 z wykorzystaniem unikalnych miejsc restrykcyjnych BamHI/NotI. Wektor pCM190 jest to układ genetyczny, który pozwala na kontrolowaną ekspresja odpowiednich genów pod kontrolą promotora tetO-CYC1 i kontrolowany pod aktywatorem tTA. Ekspresja genu jest regulowana za pośrednictwem tetracykliny lub jej pochodnych. W obecności antybiotyku w pożywce wzrostowej w stężeniach, które nie wpływają na wzrost komórek drożdży, ekspresja genu jest blokowana. Indukcja ekspresji genów zachodzi w nieobecności antybiotyku [136]. Sekwencję DNA wszystkich genetycznych konstruktów zweryfikowano przez sekwencjonowanie DNA.

2. HODOWLE KOMÓRKOWE DROŻDŻY

Do analiz wykorzystano następujące szczepy drożdżowe: tzw. szczep dziki BY4741 (MATa his3a 1 leu2a0 met15a0 ura3a0), otrzymany z bazy EUROSCARF („European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional Analysis”). Szczepy drożdżowe uL10 Δ h2 i uL10 Δ h1h2 pochodziły z kolekcji Zakładu Biologii Molekularnej (szczepy otrzymane na bazie szczepu BY4741) [62]. Hodowlę komórek drożdżowych prowadzono na podłożu YPD (1% pepton, 1% ekstrakt drożdżowy, 2% glukoza) lub SD (1,7 g/l syntetyczne podłoże Difco (BD); odpowiedni zestaw

aminokwasów: L-izoleucyna, L-walina, L-adenina, L-arginina, L-histydyna, L-leucyna, L-metionina, L-fenylalanina, L-treonina, L-tryptofan, L-tyrozyna, L-uracyl, L-lizyna; 0,5% $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$; 2% glukozy). Hodowlę drożdży zawsze poprzedzano wstępną hodowlą w objętości 5 ml podłoża YPD indukowaną z podłoża stałego. Całonocną hodowlę komórek drożdży prowadzono w temperaturze 30 °C. Tak przygotowana hodowla startowa służyła do zainicjowania właściwej hodowli. Do pożywki dodawano zawiesinę drożdży do wartości $\text{OD}_{600} = 0,1$, a następnie hodowlę właściwą prowadzono z intensywnym mieszaniem w temperaturze 30 °C. W zależności od potrzeb hodowlę przerywano w odpowiedniej fazie wzrostu poprzez odwirowanie komórek w temperaturze 4 °C.

W przypadku testów wzrostowych na podłożu stałym, całonocną hodowlę poszczególnych szczepów drożdżowych w postaci 10-krotnych rozcieńczeń od $\text{OD}_{600}=0,1$ nanoszono po 10 μl na płytki ze stałym podłożem YPD (1% pepton, 1% ekstrakt drożdżowy, 2% glukoza, 2% agar), które były uzupełnione odpowiednimi substancjami czynnymi: antybiotykami - 100 $\mu\text{g/ml}$ genetyciną (G418), 100 $\mu\text{g/ml}$ hygromycyną B (HygB), 250 $\mu\text{g/ml}$ paromomycyną (Par), 0,1 $\mu\text{g/ml}$ cykloheksymidem (CHX), 2 $\mu\text{g/ml}$ sordarinem (Sor), oraz czynnikami wywołującymi stres: 0,5 mM H_2O_2 ; 1 $\mu\text{g/ml}$ tunikamycyną, 20 mM ditiotreitołem (DTT); 0,03 % SDS, 25 $\mu\text{g/ml}$ calcofluorem; 2 $\mu\text{g/ml}$ kofeiną; 500 mM NaCl; 500 mM KCl; 1 M sorbitolem; lub pożywką suplementowaną związkami stanowiącymi alternatywne źródła węgla: 2% glukoza, 2% galaktoza, 2% etanol, lub 2% glicerol. Testy wzrostowe prowadzono w temperaturze 30 °C przez okres 3 dni.

3. METODA OZNACZENIA DŁUGOŚCI ŻYCIA ORAZ POTENCJAŁU REPRODUKCYJNEGO SZCZEPÓW DROŹDŻOWYCH

Długość życia oraz potencjał reprodukcyjny poszczególnych szczepów drożdżowych określono za pomocą metody opisanej wcześniej przez Minois i wsp. 2005 z modyfikacją Zadrag i wsp. 2008 [137, 138]. I tak, szczepy drożdżowe hodowano na bogatym podłożu YPD do osiągnięcia tzw. logarytmicznej fazy wzrostu, tj. do $\text{OD}_{600}=0,5$.

Do analizy potencjału reprodukcyjnego używano tzw. komórek dziewiczych, czyli takich, które nie wykonały jeszcze pełnego cyklu komórkowego.

W tym celu na płytkę z pełnym podłożem YPD наносono 5 μ l zawiesiny komórek pochodzącej z hodowli będącej w logarytmicznej fazie wzrostu. W fazie tej ok. 50% komórek to komórki dziewicze. Aby mieć pewność, że analizowane komórki są zsynchronizowane pod względem wieku, wykorzystując mikromanipulator wybrano od 40 do 50 komórek z utworzonym jednym pączkiem. Komórka potomna, będąca tzw. komórką dziewiczą, stanowiła materiał wyjściowy do dalszej części eksperymentu. Po uzyskaniu komórek dziewiczych pierwszą analizę przeprowadzano po 1 h. Jest to czas, w którym komórka potomna osiąga pewną minimalną objętość pozwalającą na wejście w cykl komórkowy. Następnie szalkę z komórkami sprawdzano w odstępach około 20 minut w celu oddzielania i zliczania formowanych komórek potomnych. Badania prowadzono w trybie 15 godzinnym. Po zakończeniu eksperymentu w danym dniu, szalkę umieszczano w temperaturze +4 °C na okres 9 godzin, jest to temperatura, w której komórka może zakończyć rozpoczęty cykl komórkowy, natomiast nie rozpoczyna kolejnego [139]. Wszystkie analizy wzrostu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, prowadzono w temperaturze 28 °C. W każdym eksperymencie analizowano przynajmniej 40 komórek. Dla każdego ze szczepów wykonano trzy powtórzenia biologiczne. Potencjał reprodukcyjny przedstawiono jako liczbę wyprodukowanych komórek córek.

Analiza reprodukcyjnej, post-reprodukcyjnej i całkowitej długości życia komórek drożdży prowadzono podobnie jak analizę potencjału reprodukcyjnego, tzn. wykorzystując metodę mikromanipulacji. Analizę prowadzono na podłożu pełnym YPD zawierającym barwnik Floksyna B o końcowym stężeniu 10 μ g/ml [137, 138]. Floksyna B jest barwnikiem, który jest aktywnie usuwany przez żywe komórki, natomiast kiedy komórka umiera barwnik pozostaje w komórce barwiąc ją na kolor czerwony. Dla każdego ze szczepów wykonywano 3 powtórzenia biologiczne. I tak, analizując potencjał reprodukcyjny, przedstawiany jako liczbę wyprodukowanych komórek potomnych (córek), analizowano również reprodukcyjną, post-reprodukcyjną oraz całkowitą długość życia, które wyrażono w jednostkach czasu [h]. Reprodukcyjna długość życia jest to czas od momentu, kiedy pączek staje się samodzielną komórką do wytworzenia ostatniej komórki potomnej. Post-reprodukcyjna długość życia jest to czas jaki upływa od wytworzenia ostatniej komórki potomnej do śmierci komórki. Z kolei całkowita długość życia jest to suma reprodukcyjnej i post-reprodukcyjnej długości życia [138]. Analizy

przeprowadzono za pomocą mikromanipulatora sprzęgniętego z mikroskopem optycznym Nikon Eclipse E200.

4. METODA ANALIZY CYKLU KOMÓRKOWEGO

Analizę cyklu komórkowego przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego BD FACSVerse system (BD Biosciences). Do przygotowania materiału badawczego wykorzystano łącznie 4×10^6 komórek pochodzących z logarytmicznej fazy wzrostu, $OD_{600}=0,5$. Komórki zebrano przez wirowanie, zawieszono w 1 ml 70% etanolu, a następnie inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej. 0,3 ml zawiesiny komórek wirowano, ponownie zawieszono w 50 mM cytrynianu sodu pH 7,5 a następnie wirowano i ponownie zawieszono w 1 ml roztworu RNazy (0,25 mg/ml RNazy, 50 mM cytrynian sodu pH 7,5) (Sigma-Aldrich). Po całonocnej inkubacji w 37 °C, do analizowanych próbek dodano proteinazę K (A & A Biotechnology) do końcowego stężenia 200 µg/ml, inkubowano przez 1,5 godziny w 50 °C. Następnie do próbek dodano jodku propidyny (PI, 8 g/ml) (Sigma-Aldrich) i pozostawiono w ciemności przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Analizę cyklu komórkowego przeprowadzono na BD FACSVerse system (BD Biosciences) a dane analizowano za pomocą oprogramowania BD FACSuite (BD Biosciences). Do pojedynczej analizy użyto dziesięć tysięcy komórek na jeden szczep drożdżowy w trzech powtórzeniach w każdym z trzech niezależnie wykonanym eksperymencie biologicznym.

5. IMMUNODETEKCJA BIAŁEK

W celu uzyskania ekstraktów komórkowych do analiz immunodetekcji białek wykorzystano komórki drożdżowe hodowane do logarytmicznej fazy wzrostu, $OD_{600}=1,0$. Komórki zbierano przez wirowanie i zawieszono w buforze: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 80 mM KCl, 12,5 mM MgCl₂, 6mM β-merkaptioetanol, 1mM fluorek fenylometylosulfonylowy (PMSF). Następnie przeprowadzono dezintegrację z 0,5 ml kulek szklanych (425-600 µm, Sigma-Aldrich) przez energiczne wstrząsanie w 4 °C (10 cykli po 45 s). Rozbite komórki poddano frakcjonowaniu wykorzystując wirowanie. I tak, pełny ekstrakt komórkowy uzyskano przez wirowanie przy 12000 rpm (rotor 12154-H, Sigma). Frakcje białkowe poddano rozdzielaniu wykorzystując analizę SDS-PAGE, a następnie przeprowadzono elektrotransfer

na membranę nitrocelulozową (Whatman). Immunodetekcję drożdżowych białek uL10, P1/P2 oraz uL23, przeprowadzano wykorzystując specyficzne przeciwciała. Do detekcji uL10 wykorzystano królicze poliklonalne przeciwciała anty-uL10 (rozcieńczenie 1:5000), anty-P1/P2 (rozcieńczenie 1:500), zgodnie z procedurą opisaną wcześniej [62]; przeciwciała anty-uL23 (rozcieńczenie 1:1000) zostały otrzymane od dr Ed'a Hurt'a z Heidelberg University (Niemcy). Wizualizacji kompleksów immunologicznych dokonano z użyciem drugorzędowych kozich przeciwciał anty-króliczych (Sigma) związanych z alkaliczną fosfatazą, jako substraty wykorzystując BCIP i NBT (Fermentas).

6. METODA UZYSKANIA PROFILI POLISOMÓW

Rozdział frakcji rybosomalnej w formie tzw. profili polisomów uzyskano w wyniku ultrawierowania ekstraktów komórkowych izolowanych z poszczególnych szczepów drożdżowych w gradiencie stężeń sacharozy od 7 do 47%. W celu przygotowania ekstraktu, drożdże hodowano do logarytmicznej fazy wzrostu $OD_{600}=0,4 - 0,6$ na płynnym podłożu YPD. Następnie, do hodowli dodawano cykloheksymid (CHX) (stężenie końcowe, 100 $\mu\text{g/ml}$ hodowli) przez 20 minut. W celu schłodzenia w końcowej fazie do hodowli dodano lód a następnie komórki zebrano przez wirowanie przy 8000 rpm (rotor ILA 16.250, Avanti J-26 Beckman-Coulter)/2 min./4 °C i zawieszono w buforze do lizy (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl_2 , 100 $\mu\text{g/ml}$ CHX, 1 mM (PMSF), 6 mM β -merkaptotanol, 1 nM pepstatyna A, 10 nM leupeptyna, 10 ng/ml aprotynina, inhibitor RNazy (Sigma-Aldrich). Komórki wirowano przy 4500 rpm (rotor SX4250, Allegra X-22R Beckman-Coulter) i ponownie zawieszono w buforze do lizy zawierającym dodatkowo 200 ng/ml heparyny. Zawiesinę komórek dezintegrowano z 0,5 ml objętości kulek szklanych (425-600 μm , Sigma-Aldrich) przez energiczne wstrząsanie (10 cykli po 45 s) w temperaturze 4 °C. Lizat komórkowy uzyskano na drodze wirowania, 12000 rpm (rotor 12154-H, Sigma). Ilość jednostek frakcji rybosomalnej określano na bazie pomiaru OD_{260} . Gradient przygotowano przez rozpuszczenie 27% sacharozy w buforze zawierającym 50mM Tris-acetate pH 7,0, 12mM MgCl_2 , 50mM NH_4Cl , 1mM ditiotritol (DTT) następnie zamrożonym w -20 °C i rozmrożonym bezpośrednio przed nałożeniem frakcji rybosomalnej. Na każdy gradient 7 - 47% stężenia sacharozy nanoszono piętnaście jednostek OD_{260}

frakcji rybosomalnej a następnie ultrawirowano przez 4,5 godz. przy 26500 rpm (rotor SW32Ti, Beckman-Coulter) w 4 °C i analizowano za pomocą frakcjonatora ISCO Brendel.

W celu uzyskania profilu frakcji polisomalnej wykorzystując równą liczbę komórek, szczepy drożdże hodowano jak opisano powyżej i zbierano $1,65 \times 10^9$ komórek, które następnie przygotowywano zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Analiza profili polisomów w tzw. ujęciu „runoff” została wykonana tak jak opisano powyżej z tą różnicą, że hodowlę na podłożu płynnym YPD nie traktowano CHX i odpowiednio, CHX pominięto w buforze do lizy. Ponadto, otrzymany ekstrakt komórkowy inkubowano przez 20 minut w 30 °C.

W celu uzyskania profilu polisomów w obecności antybiotyku G418, komórki szczepu kontrolnego hodowano na podłożu płynnym YPD jak opisano wcześniej z dodatkiem 100 µg/ml G418 do 2 godzinnej hodowli startowej od OD₆₀₀=0,1 do OD₆₀₀ wynoszącym od 0,4 do 0,6. Preparatykę polisomów przeprowadzono zgodnie z procedurą jak opisano powyżej, w obecności 100 µg/ml CHX. Przygotowanie polisomów dla szczepu kontrolnego i dla mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2} w obecności sordarinu (Sor) przeprowadzono w następujący sposób: hodowlę startową komórek drożdżowych prowadzono do logarytmicznej fazy wzrostu do OD wynoszącym 0,4 - 0,6. Następnie do hodowli dodano sordarin (stężenie końcowe, 40 µg/ml hodowli) przez 30 min. W celu schłodzenia w końcowej fazie do hodowli dodano lód a następnie komórki zebrano przez wirowanie przy 8000 rpm (rotor ILA 16.250, Avanti J-26 Beckman-Coulter)/ 2 min./4 °C i zawieszono w buforze do lizy (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 40 µg/ml sordarin, 1 mM (PMSF), 6 mM β-merkaptioetanol, 1 nM pepstatyna A, 10 nM leupeptyna, 10 ng/ml aprotynina, inhibitor RNazy (Sigma-Aldrich). Komórki odwirowano przy 4500 rpm (rotor SX4250, Allegra X-22R Beckman-Coulter) i ponownie zawieszono w buforze do lizy zawierającym dodatkowo 200 ng/ml heparyny. Zawiesinę komórek dezintegrowano z 0,5 ml objętości kulek szklanych (425-600 µm, Sigma-Aldrich) przez energiczne wstrząsanie (10 cykli po 45 s) w temperaturze 4 °C. Lizat komórkowy uzyskano na drodze wirowania, 12000 rpm (rotor 12154-H, Sigma). Ilość jednostek frakcji rybosomalnej określano na bazie pomiaru OD₂₆₀.

Analizę wpływu tzw. subletalnej dawki CHX wykonano wykorzystując 50 ng/ml CHX. I tak, przygotowano hodowlę startową, tzn. komórki drożdżowe

hodowano w pożywce płynnej YPD przez noc (12 h, 30 °C), następnie hodowlę rozcieńczono pożywką YPD do OD₆₀₀=0,1 z dodatkiem 50 ng/ml CHX. Hodowlę prowadzono do logarytmicznej fazy wzrostu do OD₆₀₀=0,4 - 0,6 w 30 °C. Tak otrzymane komórki posłużyły do preparatyki i otrzymania profili polisomów zgodnie z procedurą opisaną powyżej, z wyjątkiem eksperymentu „runoff”, w którym 50 ng/ml CHX było dodawane do wszystkich buforów.

Analizy powierzchni profili polisomów przeprowadzono za pomocą programowania Microcal Origin 6.0. Całkowitą powierzchnię obliczono dla wszystkich poszczególnych frakcji 40S, 60S, 80S i czterech frakcji polisomalnych w celu określenia stosunku polisomów do monosomu (P/M) oraz 40S/60S.

7. METODA ANALIZY WYDAJNOŚCI PROCESU TRANSLACJI

Do określenia wydajności procesu translacji, wykorzystano ocenę inkorporacji znakowanej radioaktywnie metioniny (³⁵S-Met) do nowo syntetyzowanych białek. W pierwszym kroku prowadzono hodowlę drożdży w pożywce minimalnej SD do logarytmicznej fazy wzrostu OD₆₀₀=0,4 - 0,6. Następnie komórki drożdżowe odwirowywano przy 8000 rpm (rotor ILA16.250, Avanti J-26 XPI Beckman-Coulter)/2min./30 °C, a następnie komórki zawieszano w pożywce minimalnej SD zubożonej o metioninę. Komórki hodowano w 30 °C przez 15 min, następnie dodano mieszaninę zawierającą metioninę, która nie była znakowana radioaktywnie do końcowego stężenia 50 nM oraz 37 kBq [³⁵S]-metioniny (37 TBq/mmol; Hartmann Analytics). Komórki drożdżowe pobierano w ilości 1 ml w odstępie 10 minut przez okres 1 godziny do pomiaru OD₆₀₀ oraz 1ml w celu natychmiastowej precypitacji białka z wykorzystaniem kwasu tróchlorooctowego - TCA. Otrzymaną frakcję białkową sączono na filtrach Whatman GF/C a następnie poziom radioaktywności zliczano przy pomocy licznika scyntylacyjnego (Beckman LS6000SE). Pomiar wydajności translacji podawano jako kinetyka wbudowywania ³⁵S-metioniny do nowo-syntetyzowanych polipeptydów i podawano jako cpm/OD600/min).

Analiza „half transit time” opierała się na porównaniu dynamiki inkorporacji ³⁵S-Met do dwóch frakcji nowo-syntetyzowanych polipeptydów, tj.: całkowitej frakcji syntetyzowanych polipeptydów (tj. powstających na rybosomie

jak i tych uwolnionych z rybosomu) oraz tych uwolnionych z rybosomu. Hodowlę komórek drożdżowych prowadzono jak opisano powyżej dla analizy pozwalającej na określenia całkowitej wydajności translacji. Z tą różnicą, że komórki drożdżowe zbierano w krótszych punktach czasowych (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 min) po 10 ml zawiesiny, która była dodawana do 10 ml 2 x stęż. buforu do lizy o temp 4 °C (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 200 ng/ml heparyny, 100 µg/ml CHX, 1 mM PMSF, 6 mM β-merkaptotanol, inhibitora RNazy (Sigma-Aldrich). Komórki wirowano i ponownie zawieszano w 500 µl buforu do lizy zawierającym dodatkowo 200 ng/ml heparyny i dezintegrowano z 0,5 ml objętości kulek szklanych (425-600 µm, Sigma-Aldrich) przez energiczne wstrząsanie (10 cykli po 45s) w temperaturze 4 °C. Lizat komórkowy uzyskano przez wirowanie (12000 rpm/4 °C/10 min). Otrzymany supernatant podzielono na dwie równe części. Pierwszą część, tj. całkowitą frakcję białkową poddano precypitacji roztworem TCA do końcowego stężenia 10% TCA, a następnie białko zebrano na filtrach Whatman GF/C i poziom inkorporacji ³⁵S-Met oznaczono w liczniku scyntylacyjnym. Drugą część poddano ultrawiwaniu przy 105 000 x g przez 45 minut w celu otrzymania tzw. frakcji postrybosomalnej, pozbawionej rybosomów i poziom inkorporacji ³⁵S-Met we frakcji białkowej uwolnionej z rybosomu analizowano w wyżej opisany sposób. Radioaktywności, w przeliczeniu na minutę, całkowitej frakcji białkowej i postrybosomalnej została wykreślona jako funkcja czasu. „*Half transit time*” (T_{1/2}) określono na podstawie przesunięcie w czasie pomiędzy dwiema liniami trendu wytyczonymi dla każdej serii danych [140].

8. METODA OZNACZENIA PRECYZJI DEKODOWANIA INFORMACJI GENETYCZNEJ

Analizy precyzji dekodowania informacji genetycznej zostały wykonane wykorzystując system dwóch lucyferaz jako układ reporterowy („*Dual Luciferase Assay Reporter System*”) – „*Renilla*” i „*Firefly*” według procedury opisanej Harger i wsp. 2003 [141]. Analizy przeprowadzono w oparciu o dwa układy. Pierwszy układ, kontrolny pozwala na konstytutywną syntezę fuzyjnego białka składającego się z dwóch aktywnych katalitycznie lucyferaz – pierwsza pochodzi z organizmu „*Renilla reniformis*”, druga z „*Photinus pyralis*” tj. robaczka świetojańskiego ang. „*firefly*”. Drugi układ genetyczny to system testowy,

identyczny jak kontrolny, z tą różnicą że zawiera modyfikacje genetyczne, która pozwala na ocenę przebiegu translacji w ujęci jakościowym. Na Fig. 15 przedstawiono schematycznie budowę testowych wektorów niosących kasetę genetyczną z układami analitycznymi. Gen kodujący lucyferazę „*renilla*” stanowi układ referencyjny, który jest syntetyzowany na poziomie podobnym jak w układzie kontrolnym, natomiast poziom syntezy lucyferazy „*firefly*” jest proporcjonalny do ilości popełnianych przez rybosom błędów.

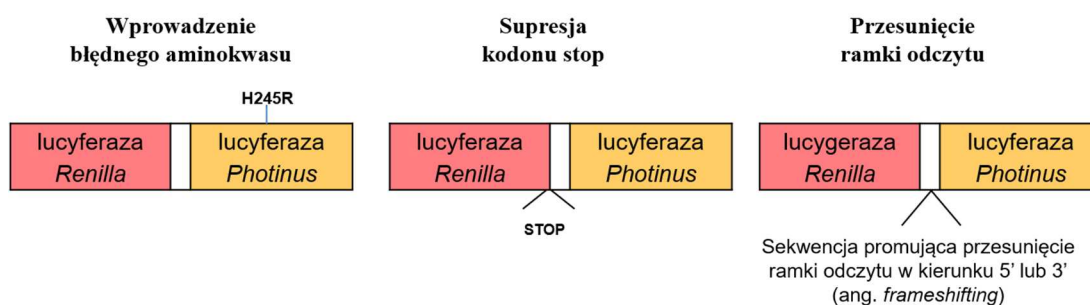


Fig. 15. Schemat systemu wykorzystującym dwie lucyferazy jako układ reporterowy (*Dual Luciferase Assay Reporter System*) – „*Firefly*” i „*Renilla*”.

Analiza „*Dual Luciferase Assay Reporter System*” pozwoliła na ocenę poziomu popełnianych przez rybosom błędów typu: wprowadzenia błędnego aminokwasu, ang. „*misincorporation*”, supresji kodonu stop, ang. „*read-through*” oraz na ocenę ważnego parametru w dekodowaniu informacji genetycznej przez rybosom jakim jest zmiana (przesunięcie) czytania ramki odczytu na mRNA przez rybosom ramki (+1, z ang. „*frameshifting*”; -1, „*frameshifting*”).

W celu przeprowadzenia analizy precyzji dekodowania informacji genetycznej na wstępie przeprowadzono transformację komórek szczepów drożdżowych BY4741 (szczep dziki), uL10 Δ h2, uL10 Δ h1h2 według standardowych procedur z octanem litu [135]. Plazmidy reporterowe stosowane do analiz opartych na systemie wykorzystującym dwie lucyferazy jako układ reporterowy („*Dual Luciferase Assay Reporter System*”) – „*Renilla*” i „*Firefly*” były następujące:

- plazmid kontrolny, pDB688 zawierający w pozycji 245 właściwy kodon tzw. ang. „*cognate*” (komplementarny) kodon CAC kodujący aminokwas histydynę;

- do oceny częstotliwości wstawiania przez rybosom błędnego aminokwasu, ang. „*misincorporation*” wykorzystano plazmid pDB868 zawierający zmutowaną formę genu dla lucyferazy „*firefly*” kodon CAC na CGC kodujący argininę (ang. „*near cognate*,” semi-komplementarny) w pozycji 245 i pDB866 także zawierający tzw. „*near-cognate*”, semi-komplementarnym kodonem CAG kodującym glutaminę w pozycji 245. Dodatkowo zmodyfikowano plazmid pDB866 tak, że wprowadzono mutację punktową, zmieniającą CAC na CGA kodującego argininę w pozycji 245, a kodon ten można uznać za tzw. *non-cognate*, nie-komplementarny kodon. Modyfikacja plazmidu była przeprowadzona za pomocą mutagenazy ukierunkowanej z użyciem zestawu QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) zgodnie z zaleceniami producenta. Ponadto, do analizy „*misincorporation*” zastosowano dodatkowe układy genetyczne wykorzystujące następujące plazmidy: pJD375, plazmid kontrolny z komplementarnym kodonem AGA w pozycji 218 w genie dla lucyferazy „*firefly*” i pJD643, z semi-komplementarnym kodonem AGC i pJD642 z nie-komplementarnym TCT w pozycji 218.
- do pomiaru częstotliwości supresji kodonu stop przez rybosom „*read-through*” wykorzystano konstrukt pDB691, w którym pomiędzy dwiema lucyferami była sekwencja nukleotydowa UGAC, zawierająca sekwencję zawierającą sygnał STOP. Zatem, synteza aktywnej lucyferazy „*firefly*” jest wynikiem pomyłki rybosomu typu ang. „*read-through*”.
- do pomiaru częstotliwości pomyłek rybosomu polegających na tzw. przesunięciu czytania ramki odczytu na mRNA przez rybosom ramki (+1, z ang. „*frameshifting*”; -1, „*frameshifting*”) jako plazmid kontrolny wykorzystano wektor pYDL analogiczny do pDB688. Do oceny tendencji rybosomu do zmiany ramki odczytu o jeden nukleotyd w kierunku 5’ (ang. -1 „*frameshifting*”) posłużono się konstruktem genetycznym pYDL-LA (pJD376), w którym pomiędzy dwiema lucyferazami była wprowadzona sekwencja nukleotydowa pochodząca z wirusa L-A promująca zmianę ramki odczytu typu -1. Ponadto, wykorzystano także konstrukt genetyczny pYDL-Ty1 (pJD377), który zawierał w tym miejscu sekwencję nukleotydową promującą zmianę ramki odczytu o 1 nukleotyd w kierunku 3’ pochodzącą z retrotranspozonu *Ty1* (ang. +1, „*frameshifting*”). W obu przypadkach,

rybosom czyta prawidłową ramkę odczytu lucyferazy „*firefly*” tylko w wyniku zmiany tejże ramki na skutek perturbacji w procesie translacji.

Plazmidy stosowane do oceny częstotliwości wstawiania przez rybosom błędnego aminokwasu (pDB688, pDB868, pDB866) oraz do pomiaru częstotliwości supresji kodonu stop przez rybosom (pDB691) zostały udostępnione przez dr David'a Bedwell'a z University of Alabama at Birmingham (USA) [142]. Natomiast plazmidy oceny częstotliwości wstawiania przez rybosom błędnego aminokwasu (pJD375, pJD642, pJD643) do pomiaru częstotliwości pomyłek rybosomu polegających na tzw. przesunięciu czytania ramki odczytu na mRNA przez rybosom ramki (+1, *frameshifting*; -1, *frameshifting*) (pJD375, pJD376, pJD377) wykorzystano plazmidy otrzymane od dr Jonathan'a Dinman'a z University of Maryland (USA) [143].

Po przeprowadzeniu transformacji komórek szczepów drożdżowych BY4741 (szczep dziki), uL10_{Δh2}, ul10_{Δh1h2} wybrane transformanty początkowo były hodowane na minimalnym, płynnym podłożu SD bez obecności uracylu przez noc w temperaturze 30 °C, następnie komórki rozcieńczono świeżym podłożem płynnym SD do OD₆₀₀ równym 0,2 i dalej hodowano aż do OD₆₀₀ równego 0,5. Komórki zebrano przez wirowanie, przemyto zimnym PBS i dezintegrowano przez energiczne wstrząsanie z 0,5 ml objętości kulek szklanych w zimnym buforze PBS uzupełnionym 1 mM PMSF, 5 mM ditiotreiolem (DTT) i 1 mg/ml żelatyny wieprzowej (Sigma-Aldrich) przez okres 5 min. Ekstrakty komórkowe uzyskano przez wirowanie przy 12000 g przez 10 min.

Do analizy wpływu inhibitorów translacyjnych na precyzję dekodowania informacji genetycznej, hodowle komórkowe, tj. szczep dziki (BY4741) traktowano antybiotykiem G418 (100 lub 200 µg/ml) przez 5 h przed przygotowaniem ekstraktu. Dalej postępowano jak opisano wyżej.

Aktywność lucyferazy oznaczano ilościowo przy użyciu „*Dual Luciferase Assay Reporter System*” (Promega) zgodnie z instrukcjami producenta, z wyjątkiem końcowego etapu gdzie do 2 µl ekstraktu komórkowego dodano do 20 µl odczynnika LAR II i przez 10 s odczytywano sygnał bioluminescencji. Następnie do studzienki wprowadzono 20 µl odczynnika Stop & Glow, który wygaszał sygnał generowany przez lucyferazę „*firefly*” i jednocześnie dostarczał substratu dla lucyferazy „*renilla*”. Ponownie odczytywano poziom bioluminescencji przez 10 s. Reakcje prowadzono w 96 dołkowej płytce pomiarowej. Otrzymany wynik wyrażono jako

stosunek aktywności lucyferazy „*firefly*” do „*renilla*” uzyskany dla wektora badanego, podzielony przez współczynnik aktywności („*firefly*”/„*renilla*”) uzyskany dla wektora kontrolnego i pomnożony przez 100%. Wyniki są średnim wynikiem z trzech niezależnych eksperymentów biologicznych.

9. INNE METODY

Elektroforezę SDS-PAGE prowadzono wg standardowej procedury [144]. „*Western blotting*” przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną wcześniej przez Towbin i wsp. 1979 [145]. Stężenie białka określano z wykorzystaniem procedury Bradford, stosując komercyjnie dostępny odczynnik z firmy Bio-Rad. Jako białka referencyjnego użyto albuminy surowicy bydlęcej – standardu firmy Sigma. Elektroforezę isoelektroogniskowania (IEF) białek rybosomalnych przeprowadzono na płycie żelowej w zakresie pH 2,5 do 5,0 i barwieniu srebrem [45]. Stężenie frakcji rybosomalnej było ustalone zgodnie z procedurą opisaną przez van der Zeijst i wsp. 1972 [146].

IV. WYNIKI

1. CHARAKTERYSTYKA MUTANTÓW DROŹDŻOWYCH

Kluczowy element białkowy centrum GTPazowego na rybosomie eukariotycznym stanowią białka P, które wraz z białkiem uL10, tworzą kompleks pentameryczny - uL10-(P1-P2)₂, zakotwiczony na rybosomie za pośrednictwem białka uL10. W komórkach drożdżowych, kompleks ten posiada konfigurację pentameryczną, jednakże białka P w trakcie ewolucji uległy zróżnicowaniu na cztery niezależne polipeptydy, P1A, P1B, P2A i PB, formując dwa dimery P1A-P2B i P1B-P2A, zakotwiczone na białku uL10 - uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A) [48]. Uważa się, że białka te wspomagają centrum GTPazowe w rekrutacji czynników translacyjnych trGTPaz, a przede wszystkim odgrywają kluczową rolę w stymulacji hydrolizy GTP katalizowanej przez trGTPazy. Energia uwalniana podczas hydrolizy GTP jest motorem napędowym poszczególnych etapów procesu translacji, co zapewnia jednokierunkowość w działaniu maszynery translacyjnej. Chociaż rola białek P w stymulacji hydrolizy GTP przez różne trGTPazy jest dobrze udokumentowana *in vitro*, jednak ich dokładna funkcja na rybosomie, a zwłaszcza rola multiplikacji tych białek nie jest znana.

W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę wyjaśnienia roli powielenia białek P w formie kompleksu pentamerycznego. Jako model badawczy wykorzystano komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* szczepu BY4741, w których na bazie zbiegów genetycznych zmodyfikowano konfigurację kompleksu białek P [62]. Do prac badawczych wykorzystano zestaw mutantów drożdżowych, które zostały przygotowane w Zakładzie Biologii Molekularnej UMCS na drodze manipulacji genetycznych wykorzystując zjawisko homologicznej rekombinacji, a operacje te wykonano na genomie drożdżowym [62]. Mutanty te posiadały zmodyfikowane rybosomalne białko uL10 w formie delekcji jego fragmentów, tak że poszczególne miejsca wiążące dimery białek P1A-P2B lub P1B-P2A zostały usunięte. W konsekwencji, poszczególne mutanty drożdżowe posiadały rybosomy z różną kompozycją białek P w obrębie centrum GTPazowego. I tak, wykorzystano trzy szczepy drożdżowe: tzw. szczep dziki zawierający rybosomy z pełnym kompleksem białek P, uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A), oraz dwa mutanty, mutant uL10_{Δh2} - uL10-(P1A-P2B), pozbawiony dimeru P1B-P2A i mutant uL10_{Δh1h2},

którego białko uL10 było pozbawione wszystkich miejsc wiążących białka P (Fig. 16).

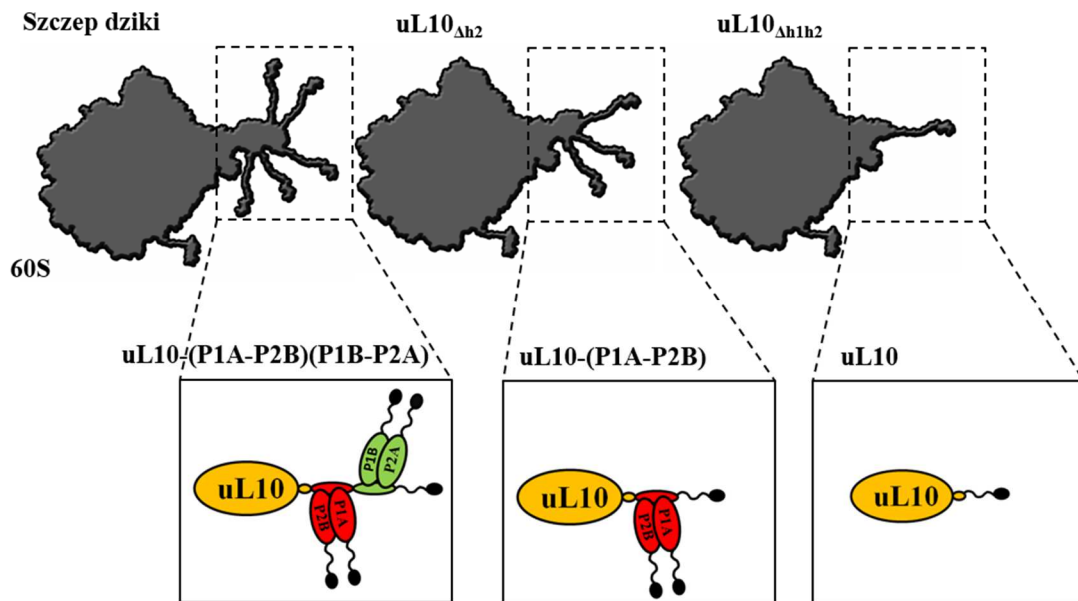


Fig. 16. Model struktury rybosomalnych podjednostek 60S rybosomu eukariotycznego wraz ze schematem przedstawiającym konfigurację kompleksu białek P w poszczególnych szczepach drożdżowych. Szczep dziki - *Saccharomyces cerevisiae* BY4741; $uL10_{\Delta h2}$ - mutant drożdżowy posiadający konfigurację kompleksu białek P - $uL10$ -(P1A-P2B); $uL10_{\Delta h1h2}$ - mutant drożdżowy z pojedynczym białkiem uL10 niezdolnym wiązać białka P. Dolny panel: poszczególne fragmenty białka uL10 oznaczono kolorami: żółtym - domena wiążąca się do rRNA, czerwonym - miejsce wiązania dla dimeru białek P1A/P2B, zielonym - miejsce wiązania dla dimeru białek P1B/P2A; dimery białek P1A/P2B oraz P1B/P2A oznaczono odpowiednio kolorem czerwonym i zielonym; czarne kropki na schemacie reprezentują konserwatywne C-terminalne fragmenty.

Pierwszym krokiem podjętych analiz było zweryfikowanie kompozycji białek rybosomalnych w obrębie kompleksu pentamerycznego na rybosomie drożdżowym. Wykonano analizę *western-blotting* używając specyficznych przeciwciał anti-uL10, co umożliwiło detekcję poszczególnych delecyjnych form białka uL10. Analiza potwierdziła, że wyizolowane rybosomy ze szczepu dzikiego zawierają tzw. natywne białko uL10 o masie 34 kDa, zaś białko uL10 z frakcji rybosomalnej izolowanej z mutantów drożdżowych $uL10_{\Delta h2}$ i $uL10_{\Delta h1h2}$ posiada masę ok. 31 i 28 kDa potwierdzając, że są to formy delecyjne pozbawione fragmentów 230-258 (miejsce wiązania dla dimeru białek P1B-P2A) i 199-258 (miejsce wiązania dla dimeru białek P1A-P2B i P1B-P2A) (Fig. 17). W celu dalszej weryfikacji przeprowadzono analizę *western-blotting* używając przeciwciał

anty-P1A/P2B. Należy podkreślić, że użyte przeciwciała rozpoznają wszystkie cztery drożdżowe białka P. Białka te posiadają wysoko konserwatywne C-terminalne fragmenty polipetydowe, które są rozpoznawane na drodze tzw. reakcji krzyżowych. We frakcji rybosomowej izolowanej z mutantu uL10 Δ h1h2 nie wykryto białek P, a ich obecność wykazano na rybosomach izolowanych z mutantu uL10 Δ h2, jednakże sygnał wykazywał mniejszą intensywność, co wskazuje na zaburzoną kompozycję białek P w obrębie centrum GTPazowego w mutancie uL10 Δ h2 (Fig. 17).

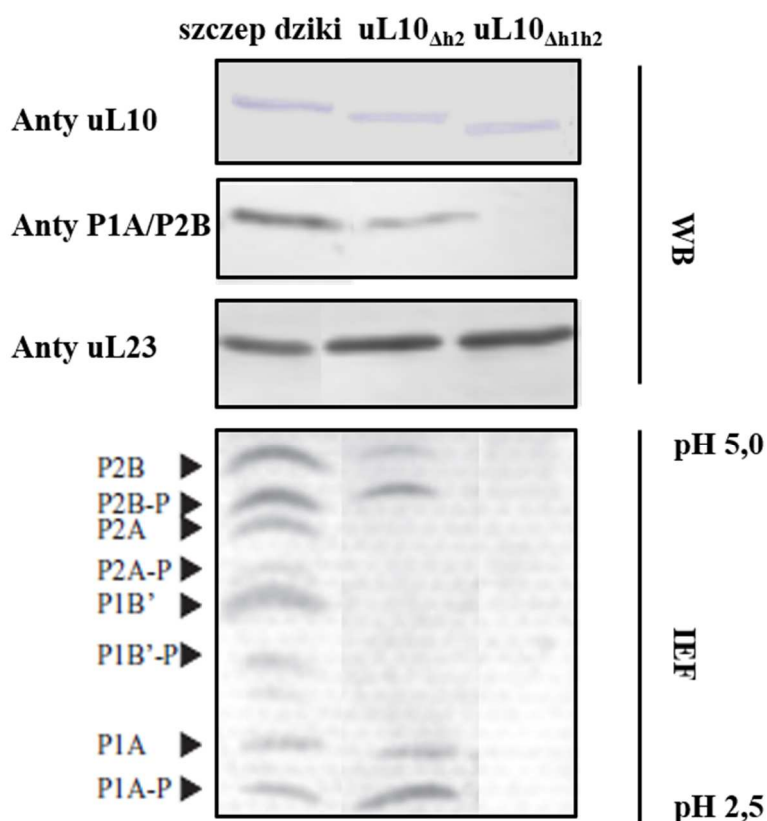


Fig. 17. Identyfikacja rybosomowych białek uL10 i P1/P2 wchodzących w skład kompleksu pentamerycznego. Panel - WB (*western-blotting*), immunodetekcja białek uL10, P1/P2 oraz uL23. Immunodetekcja białka uL23 stanowi kontrolę ilości zastosowanych rybosomów w analizie WB. Panel - IEF, izoelektroogniskowanie, pozycję poszczególnych białek P wskazano strzałką, formy ufosforylowane zaznaczono literą P, zaś P1B' oznacza formę skróconego białka P1B ze względu na podatności na degradację proteolityczną podczas przygotowywania preparatów frakcji rybosomalnych

W celu dalszej identyfikacji kompozycji białek P na rybosomach poszczególnych mutantów drożdżowych wykonano analizę izoelektroogniskowania.

Analiza frakcji rybosomalnych izolowanych ze szczepu dzikiego oraz z mutantów wskazała, że na rybosomach szczepu dzikiego występuje pełny zestaw białek P, zaś rybosomy z mutantu uL10 Δ_{h2} posiadają białka P1A i P2B a rybosomy z mutantu uL10 Δ_{h1h2} pozbawione są białek P (Fig. 17).

1.1.Charakterystyka fenotypowa

W przedstawionych analizach *western-blotting* oraz izoelektroogniskowania wykazano, że modyfikując miejsce wiązania białek P w obrębie rybosomalnego białka uL10, kompozycja kompleksu białek P na rybosomach w badanych szczepach drożdżowych jest zmieniona. Na rybosomie drożdżowym w komórkach badanych mutantów drożdżowych występuje jeden dimer P1A-P2B (mutant uL10 Δ_{h2}) lub brak jest białek P (mutant uL10 Δ_{h1h2}). W tym miejscu należy podkreślić, że białko uL10 z fragmentem domeny P stanowi minimalny element tzw. „kciuka” rybosomalnego zapewniający funkcjonowanie rybosomu [33, 62]. W celu określenia cech fenotypowych badanych szczepów drożdżowych przeprowadzono tzw. testy wzrostowe z wykorzystaniem alternatywnych źródeł węgla jakimi były: glukoza, galaktoza, etanol czy glicerol. Na podłoże stałe zawierające odpowiednie źródło węgla nanoszono zawiesinę komórek drożdżowych w formie szeregu rozcieńczeń. Wzrost komórek analizowano po trzech dniach inkubacji w temperaturze 30 °C. Komórki mutantu uL10 Δ_{h1h2} charakteryzowały się powolnym wzrostem, w szczególności na podłożu z galaktozą wzrost był znacząco obniżony w porównaniu do komórek kontrolnych, jakim były komórki szczepu dzikiego (Fig. 18). Co ciekawe, komórki szczepu uL10 Δ_{h1h2} nie rosły na podłożu zawierającym tzw. niefermentowalne źródła węgla tj. etanol czy glicerol (Fig. 18), w przeciwieństwie do szczepu uL10 Δ_{h2} , który nie wykazywał znaczących zmian fenotypowych w porównaniu do komórek szczepu dzikiego.

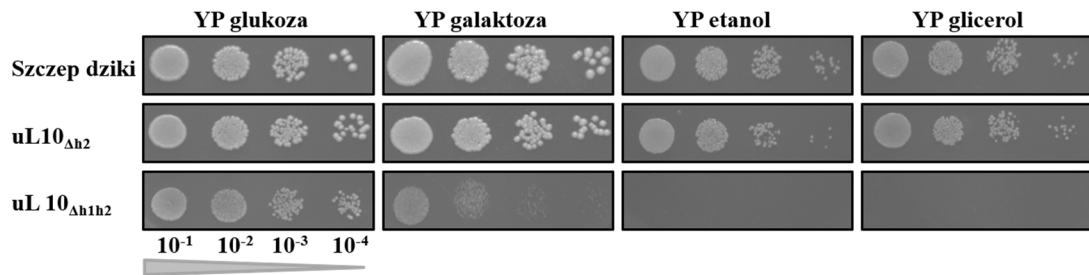


Fig. 18. Analiza fenotypowa szczepów drożdżowych przy wykorzystaniu różnych źródeł węgla. Komórki drożdży nanoszono na podłoże stałe YP uzupełnione różnymi źródłami węgla, w formie dziesięciokrotnych rozcieńczeń mieszaniny drożdży o OD₆₀₀=0,1.

W celu dalszej charakterystyki fenotypowej wykonano serię testów wzrostowych na podłożu stałym YPD, wykorzystując tzw. zmienne warunki środowiskowe (Fig. 19). I tak, zastosowano między innymi: stres osmotyczny, temperaturowy, oksydacyjny oraz wykorzystano takie związki jak calcofluor, kofeina, SDS wywołujące defekt w ścianie komórkowej czy tunikamycyna i DTT, będące induktorem szlaku UPR (ang. „*unfolded protein response*”) oraz wzrost na podłożu o alkalicznym pH. Analiza wzrostu komórek poszczególnych szczepów drożdżowych w zaaplikowanych warunkach stresowych pokazały, że jedynie w przypadku stresu oksydacyjnego przy zastosowaniu czynnika H₂O₂ zaobserwowano zahamowanie wzrostu komórek dla mutantu uL10_{Δh1h2} (Fig. 19A). W przypadku innych testowanych warunków, wszystkie szczepy zachowywały się podobnie, nie wykazując wrażliwości na zastosowane warunki stresowe. Analizy te wskazują, że zaburzenia w obrębie centrum GTPazowego, w formie zmiany ilości białek P, nie wpływają w istotny sposób na adaptacje komórki drożdżowej do zmiennych warunków środowiskowych, poza stresem oksydacyjnym wywierający negatywny wpływ na mutantu uL10_{Δh1h2}.

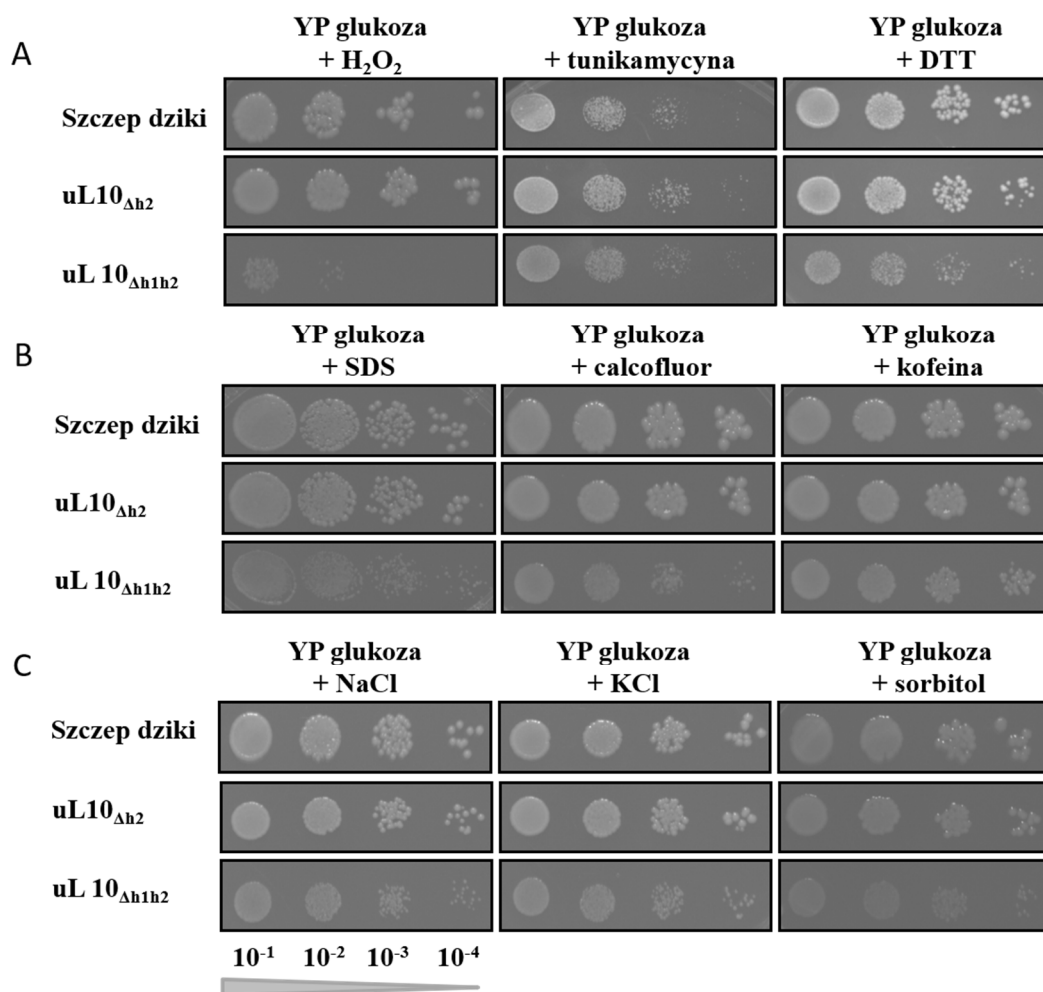


Fig. 19. Analiza fenotypowa szczepów drożdżowych w zmiennych warunkach środowiskowych..

Poszczególne rozcieńczenia komórek drożdżowych (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) nanoszono na podłoże stałe YP uzupełnione glukozą oraz z dodatkiem różnych związków wywołujących stres, np.: 0,5 mM H₂O₂, 1 µg/ml tunikamycyną, 20 mM DTT, 0,03 % SDS, 25 µg/ml calcofluor, 2 µg/ml kofeina, 500 mM NaCl, 500 mM KCl, 1 M sorbitol.

W kolejnych badaniach, przeprowadzono analizę długości życia oraz potencjału reprodukcyjnego badanych szczepów drożdżowych. I tak, określono tzw. potencjał reprodukcyjny (ang. „*reproductive potential*”) (liczba wygenerowanych komórek potomnych przez komórkę „matkę”), reprodukcyjny czas życia komórki (ang. „*reproductive lifespan*”) (czas w jakim komórki zdolne są do podziałów), post-reprodukcyjny czas życia komórki (ang. „*post-reproductive lifespan*”) (czas życia komórki po reprodukcyjnym czasie życia komórki) oraz całkowity czas życia komórki, będący sumą reprodukcyjnego i post-reprodukcyjnego czasów życia. Dodatkowo określono tzw. średni czas generacji dla każdej analizowanej komórki tj. czas w jakim komórka „matka” generuje jedną komórkę

potomną. W celu przeprowadzenia wyżej wymienionych analiz hodowlę poszczególnych szczepów drożdżowych prowadzono w podłożu płynnym YPD, do osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu. Do określenia żywotności komórek drożdżowych wykorzystano floksynę B jako znacznik martwych komórek, które tracą integralność błony komórkowej w wyniku czego barwnik może wnikać do przestrzeni komórkowej barwiąc cytozol na różowo/czerwony kolor. W celu analizy długości życia i potencjału reprodukcyjnego, wykorzystano mikromanipulator. Podczas jednego eksperymentu analizowano czterdzieści pojedynczych komórek w obrębie każdego badanego szczepu drożdżowego.

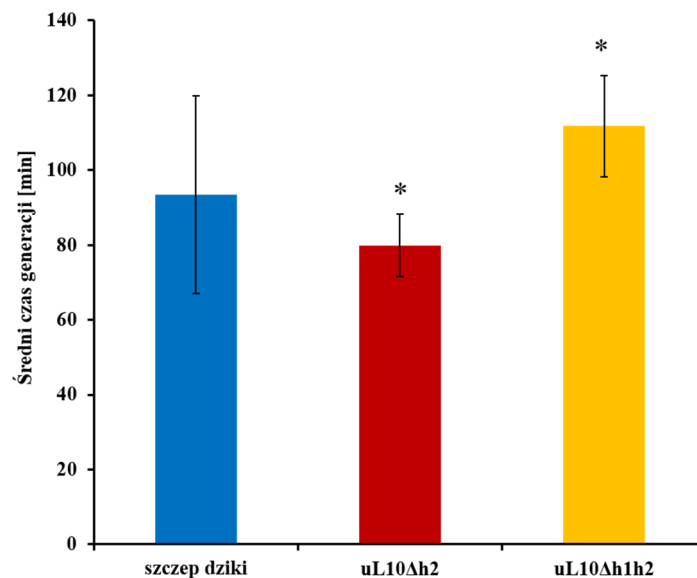


Fig. 20. Analiza czasu generacji komórek drożdżowych. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie przy $P < 0,001$ określone za pomocą testu t Studenta.

W wyniku przeprowadzanych analiz wykazano, że średni czas generacji komórek dla mutantu uL10 Δ h1h2 był znacząco wydłużony i wynosił 115 minut, w stosunku do 95 minut dla komórek szczepu dzikiego, czy mutantu uL10 Δ h2 (Fig. 20). Analiza czasu życia komórek badanych mutantów wskazała, że szczep uL10 Δ h1h2 charakteryzuje się wydłużonym tzw. całkowitym czasem życia komórek w porównaniu do szczepu dzikiego, wynoszącym średnio 116 godzin (Fig 21B, Tabela 1). W przypadku komórek szczepu uL10 Δ h2, całkowity czas życia komórki jest nawet skrócony w stosunku do szczepu kontrolnego i wynosi średnio 88 godzin. (Fig. 21D, Tabela 1). Ponadto wykazano, że komórki mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2 charakteryzują się znacznie wydłużonym reprodukcyjnym czasem życia, tj. średnio 74,83 godzin w stosunku do szczepu dzikiego (średnio 44 godzin)

(Fig. 21B, Tabela 1), podczas gdy ich czas post-reprodukcyjny skraca się średnio do 41 godzin w stosunku do 60 dla komórek szczepu dzikiego.

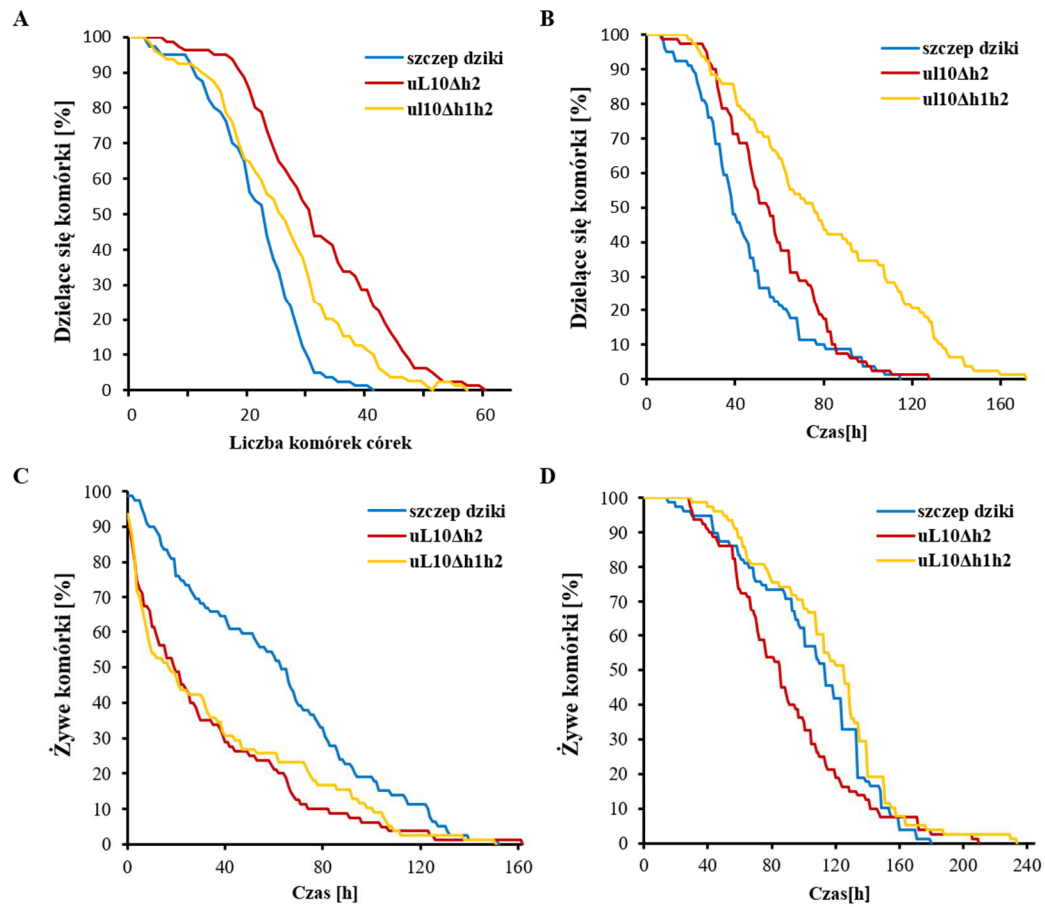


Fig. 21. Analiza czasów życia i potencjału reprodukcyjnego komórek drożdżowych. Potencjał reprodukcyjny (A), Reprodukcyjny czas życia komórek (B), post-reprodukcyjny czas życia komórek (C), całkowity czas życia komórek badanych szczepów drożdżowych (D). Przedstawione wyniki uzyskano analizując populację łącznie 40 komórek w jednej analizie, w dwóch niezależnych eksperymentach .

Tabela. 1 Średni potencjał reprodukcyjny, reprodukcyjny czas życia komórki, post-reprodukcyjny czas życia komórki, oraz całkowity czas życia komórki drożdżowej.

Szczep	Potencjał reprodukcyjny (liczba komórek potomnych)	Reprodukcyjny czas życia komórki [h]	Post-reprodukcyjny czas życia komórki [h]	Całkowity czas życia komórki [h]
Szczep dziki	20,55±7,33	44,88±24,06	60,79±39,89	105,67±39,51
uL10_{Δh2}	30,85±11,67*	56,66±23,21*	31,76±35,16*	88,63±40,77*
uL10_{Δh1h2}	24,53±9,23*	74,83±36,12*	41,65±44,27*	116,00±45,31

Dane przedstawiono jako odchylenie standardowe ze wszystkich badanych komórek podczas dwóch niezależnych eksperymentów (40 komórek w każdym doświadczeniu). Gwiazdką oznaczono istotność statystyczną, różnicę między szczepem dzikim w porównaniu z mutantami, przy $P < 0,01$, (analiza t Studenta).

Analiza czasu życia komórki drożdżowej w zakresie analizowanych szczepów drożdżowych wskazała, że komórki mutantu uL10_{Δh1h2} posiadają zaburzone procesy związane z podziałem jak i z czasem życia. W związku z powyższym, wykonano analizę cyklu komórkowego badanych szczepów drożdżowych wykorzystując cytometr przepływowy. W typowej analizie cyklu komórkowego drożdży można zauważyć charakterystyczny bimodalny rozkład w obrębie populacji komórek drożdżowych odzwierciedlający tzw. stan 1N i 2N, odpowiadający fazom G1 i G2/M w cyklu komórkowym. Wyraźnie widoczna przerwa między dwoma frakcjami 1N i 2N reprezentuje komórki w fazie S (Fig. 22, szczep dziki). Analiza cyklu komórkowego szczepu dzikiego wskazała dwie charakterystyczne frakcje 1N i 2N (z charakterystyczną dominacją frakcji 2N) oraz dobrze zaznaczoną frakcję S. Co ciekawe, w komórkach drożdży uL10_{Δh2} dystrybucja między frakcjami 1N i 2N jest zaburzona, tj. występuje równowaga między dwoma frakcjami. Natomiast, analiza cyklu komórkowego dla mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2} wskazała na znaczne zaburzenia objawiającymi się dominacją frakcji 1N oraz obecnością frakcji S na bardzo niskim poziomie (Fig. 22). Analiza ta wskazuje, że brak białek P na rybosomie, może wpływać na zaburzenie cyklu komórkowego, a przede wszystkim przedłużenie cyklu komórkowego w fazie G1, co może tłumaczyć znacznie mniejszą dynamikę wzrostu mutantu uL10_{Δh1h2}.

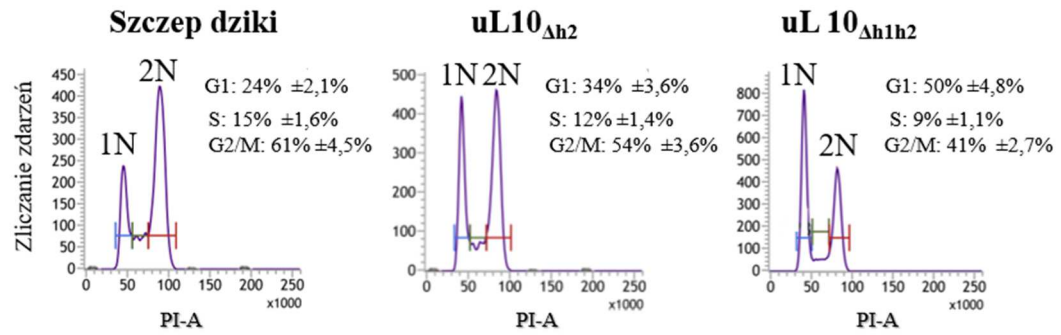


Fig. 22. Analiza cyklu komórkowego badanych szczepów drożdżowych. Histogramy frakcji 1N, 2N i S drożdży uzyskane przy użyciu cytometru przepływowego. 1N i 2N reprezentują odpowiednio fazy G1 i G2/M w populacji komórek drożdżowych. Wstawki, G1, S i G2/M pokazują rozkład sygnału między fazami G1 (bramka niebieska), S (bramka zielona) i G2/M (bramka czerwona) wyrażonymi w procentach, wartości są średnimi z trzech niezależnych eksperymentów.

1.2. Analiza wpływu białek P na metabolizm komórki

W analizie funkcjonalnej, wadliwy fenotyp wywołany mutacją w genie kodującym badane białko może być zniwelowany przez ekspresję genu „typu dzikiego” w komórkach posiadających zmutowany gen, wykorzystując odpowiednie wektory genetyczne. W związku z powyższym, zbadano czy defekty spowodowane mutacją w genie kodującym uL10 mogą zostać przywrócone przez komplementację genem kodującym uL10 o pełnej długości, co zapewni ekspresję niezmiennego białka uL10 w komórkach szczepu drożdżowego uL10 Δ h1h2.

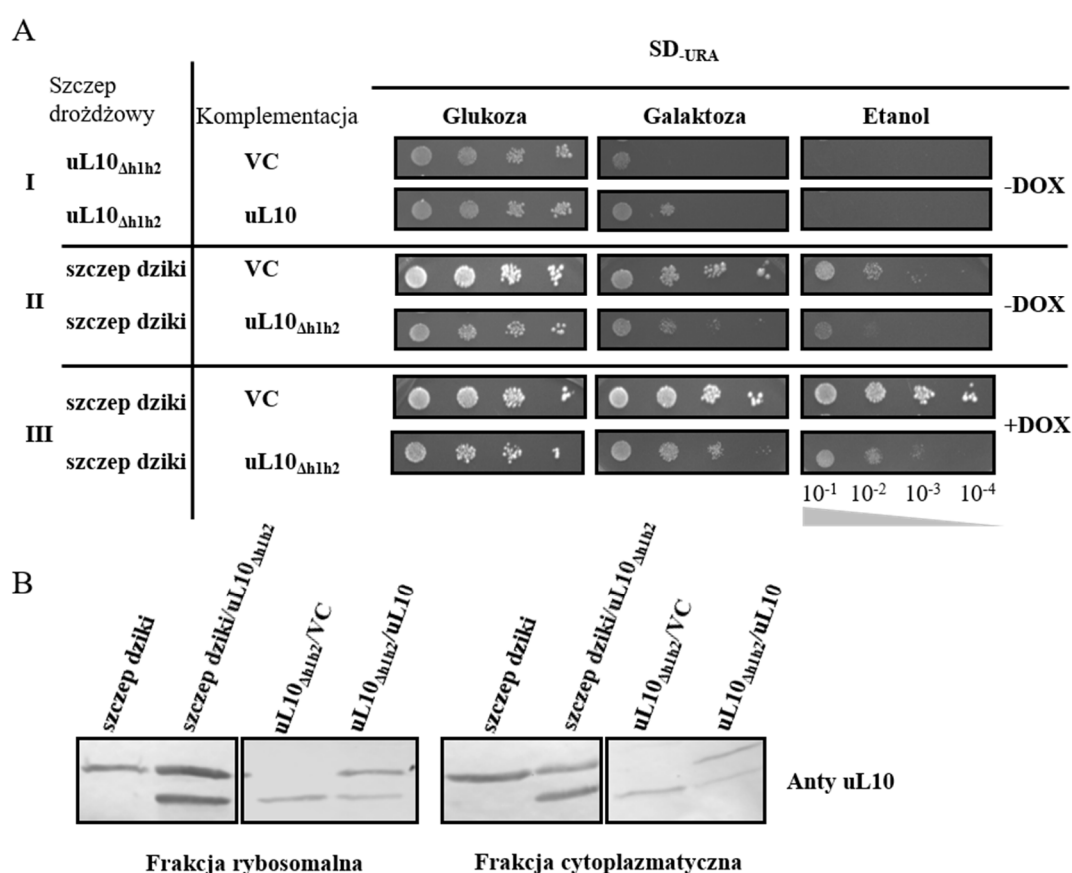


Fig. 23. Komplementacja komórek mutantu uL10 Δ h1h2 oraz szczepu dzikiego. A: Wzrost komórek mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2 na pożywce SD-URA uzupełnionej różnymi źródłami węgla. Komórki transformowano wektorem kontrolnym -VC lub z wektorem zawierającym geny dla pełnej długości białka uL10 lub zmodyfikowanego uL10 Δ h1h2. Zawiesinę komórek drożdży nanoszono na płytki z pożywką SD-URA i hodowano przez 3 dni pod nieobecność lub w obecność doksycykliny (DOX) w celu indukcji lub supresji ekspresji genów uL10 lub uL10 Δ h1h2. B: Analiza *western blotting* pełnej długości i skróconego białka uL10 przy użyciu specyficznych poliklonalnych przeciwciał anty-uL10. Analizowano dwie frakcje: całkowitą frakcję rybosomalną i frakcję cytoplazmatyczną pozbawioną rybosomów.

W celu przeprowadzenia komplementacji mutantów drożdżowych, przygotowano wektory genetyczne, które zapewniały ekspresję białka uL10 o pełnej długości oraz dodatkowo wykorzystano wektor zawierający gen kodujący białko uL10 w wersji skróconej tak jak w mutancie uL10 Δ h1h2. Analizę wykonano przede wszystkim dla mutantu uL10 Δ h1h2, który wykazywał największe zmiany fenotypowe. Analizy wzrostowe pokazały, że obecność natywnej kopii białka uL10 tylko nieznacznie przywróciła fenotyp wolno rosnących komórek szczepu uL10 Δ h1h2 (Fig. 23A, górny panel). Jednakże należy podkreślić, że komplementacje wykonano wykorzystując mutanty, które posiadają modyfikację na genomowym DNA, co skutkuje ciągłą ekspresją zmodyfikowanego uL10, a tym samym obecnością skróconego białka uL10. W związku z tym, przyczyną niepełnego przywrócenia fenotypu „dzikiego” dla komórek mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2 może być niska ekspresja pełnego białka uL10 oraz obecność formy delecyjnej. Potwierdzeniem tego przypuszczenia jest analiza *western blotting*. Zarówno pełnej długości, jak i skrócony wariant uL10 wykryto we frakcjach rybosomalnych i we frakcji cytoplazmatycznej (Fig. 23B). Wskazuje to, że nie ma różnic zarówno w ilości białka uL10 „typu dzikiego” jak i formy skróconej, a co ciekawe nie ma różnic w powinowactwie tych białek do rybosomów, ponieważ ulegają one integracji równie wydajnie. Zatem, można przypuszczać, że już sama obecność nawet małej puli rybosomów ze zmodyfikowanym białkiem uL10, może wywierać szkodliwy wpływ na ogólny metabolizm komórkowy. W celu weryfikacji tego założenia, zastosowano podejście alternatywne. Przeprowadzono ekspresję genu dla skróconej wersji białka uL10 Δ h1h2 w komórkach szczepu dzikiego, przy użyciu wektora pCM190. W wektorze tym ekspresja odpowiednich genów jest prowadzona pod kontrolą promotora tetO-CYC1 i kontrolowana za pośrednictwem aktywatora tTA (indukcja przez nieobecność antybiotyku doksycykliny - DOX). W otrzymanych transformantach skrócone białko skutecznie konkurowało z natywnym uL10 i zostało znalezione we frakcjach rybosomalnych i cytoplazmatycznych, co pokazano za pomocą analizy *western blotting* (Fig. 23B). Komórki szczepu dzikiego z ekspresją plazmidu z genem dla białka delecyjnego uL10 Δ h1h2 wykazywały zmniejszoną szybkość wzrostu zarówno na podłożach stałych SD-URA w obecności glukozy jak i galaktozy (Fig. 23A, środkowy panel). Ponadto, komórki te nie były w stanie efektywnie wykorzystać etanolu jako jedyne źródła węgla, tak jak miało to miejsce w przypadku komórek mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2, wykazując podobną

charakterystykę fenotypową co mutant genomowy. Ponieważ gen dla wariantu uL10_{Δh1h2} znajduje się pod kontrolą układu regulacyjnego tetO/tTA, możliwe jest regulowanie jego ekspresji na bazie poziomu antybiotyku DOX (-DOX, stymulowanie ekspresji, +DOX, represji ekspresji). Zarówno szybkość wzrostu, jak i zdolność do wykorzystania alternatywnych, niefermentowalnych źródeł węgla zostały przywrócone przez represję genu dla białka uL10_{Δh1h2}. Analizy te wskazały, że ekspresja białka w formie skróconej (uL10_{Δh1h2}) wywiera dominujący negatywny wpływ na komórki drożdży, niezależnie od układu eksperymentalnego jaki zastosowano (Fig. 23A, dolny panel, + DOX).

2. ANALIZA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA POSZCZEGÓLNYCH ETAPÓW TRANSLACJI

2.1. Analiza ilościowa procesu biosyntezy białka

Aktywność translacyjna rybosomu realizowana jest w obrębie jego trzech funkcjonalnych miejsc: centrum dekodującego, centrum peptydylotransferazy oraz centrum GTPazowego. Centrum dekodujące zlokalizowane jest na małej podjednostce rybosomu i odpowiada za dekodowanie informacji genetycznej zawartej w mRNA. Centrum peptydylotransferazy znajduje się na dużej podjednostce rybosomalnej a jego podstawową funkcją jest udział w procesie formowania wiązania peptydowego. W obrębie dużej podjednostki znajduje się również centrum GTPazowe, którego funkcja polega na stymulacji aktywności GTPazowej czynników translacyjnych, dzięki którym proces translacji przebiega wydajnie. W związku z tym, proces biosyntezy białka, realizowany za pośrednictwem rybosomu i jego poszczególnych centrów aktywnych, można rozpatrywać w zakresie dwóch parametrów: precyzji działania, przede wszystkim zależnej od centrum dekodującego oraz szybkości działania, zależnej od współdziałania czynników translacyjnych z rybosomem za pośrednictwem centrum GTPazowego.

W celu określenia parametru jakim jest szybkość funkcjonowania maszynerii translacyjnej w badanych szczepach drożdżowych oceniano wydajności procesu translacji poprzez analizę inkorporacji znakowanej radioaktywnie metioniny - ^{35}S -Met do nowo syntetyzowanych białek (Fig. 24). W tym celu, hodowlę szczepów drożdżowych prowadzono w minimalnym podłożu płynnym SD, a następnie pożywkę suplementowano dodatkiem ^{35}S -Met. Komórki drożdżowe pobierano w odstępie 10 minut przez okres 1 godziny, a następnie (po uprzedniej precypitacji białek z użyciem TCA i izolacji frakcji białkowej) określono poziom radioaktywności we frakcji białkowej przy pomocy licznika scyntylicyjnego. Analiza wykazała spadek wydajności procesu translacji dla badanych mutantów a w szczególności dla szczepu uL10 Δ h1h2, w którym wydajności translacji wynosiła około 50% w stosunku do szczepu kontrolnego, zaś w przypadku mutantu uL10 Δ h2 sprawność procesu translacji była tylko nieznacznie zmniejszona i wynosiła ok. 85% (Fig. 24, wstawka).

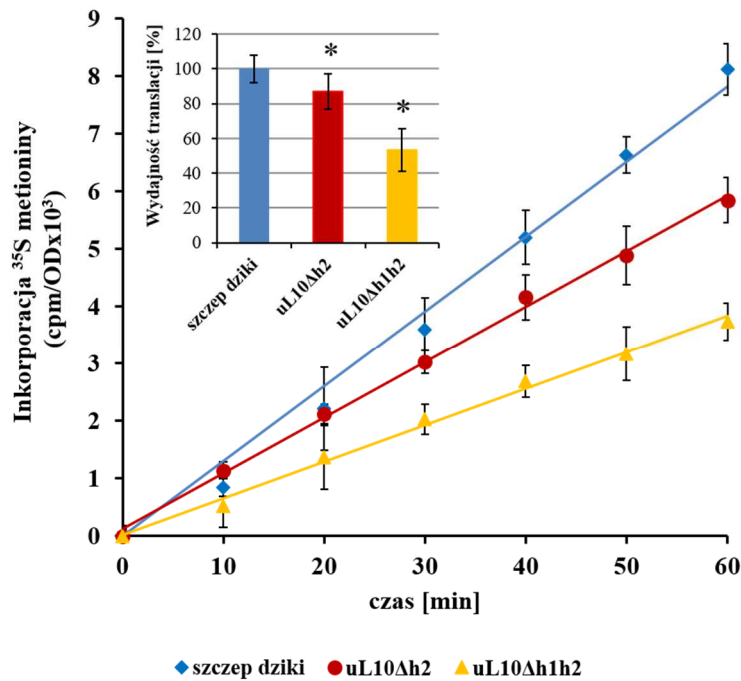


Fig. 24. Analiza wydajności procesu translacji badanych mutantów drożdżowych. Pomiar wydajności translacji wykonano na drodze analizy kinetyki wbudowywania ^{35}S -metioniny do nowo syntetyzowanych polipeptydów. Błąd pomiaru przedstawiono jako odchylenia standardowe, wykorzystano dane z trzech niezależnych eksperymentów. Wstawka, normalizacja uzyskanych wyników wydajności translacji mutantów w stosunku do wydajności translacji komórek kontrolnych szczepu dzikiego wyrażone jako 100%. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie przy $P < 0,05$ określone za pomocą t Studenta.

Rozpatrując wydajność translacji, można założyć, że biosynteza białka ma miejsce głównie na etapie elongacji w cyklu translacyjnym. Zatem, w celu określenia wydajności elongacji łańcucha polipeptydowego przeprowadzono tzw. analizę „*half transit time*”. Analiza ta opiera się na porównaniu dynamiki inkorporacji ^{35}S -Met dla dwóch frakcji: nowo-syntetyzowanych polipeptydów, tj. całkowitej frakcji syntetyzowanych polipeptydów (tj. powstających na rybosomie jak i tych uwolnionych z rybosomu) oraz tych uwolnionych z rybosomu. Parametr ten opisuje średnią wydajność rybosomu w cyklu elongacyjnym. Należy jednak nadmienić, że analiza „*half transit time*” zawiera także etap terminacji procesu translacji. Wykazano, że wartość „*half transit time*” jest zbliżona, wynosi około 30 sekund, zarówno dla komórek szczepu dzikiego jak i mutantów uL10 Δ h1h2 oraz uL10 Δ h2 (Fig. 25).

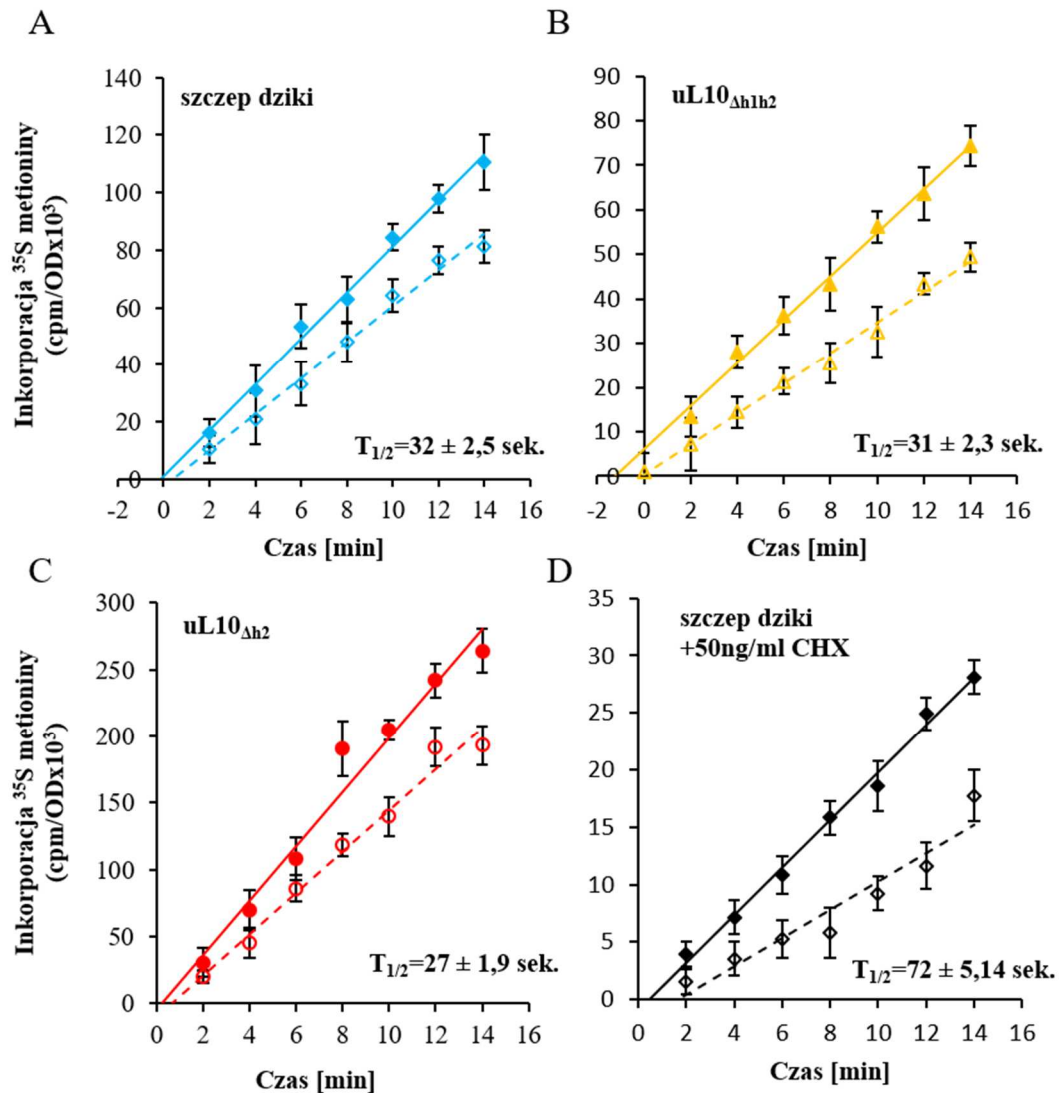


Fig. 25. Analiza wydajności procesu translacji na etapie elongacji/terminacji tzw. *half transit time*. Wykresy przedstawiają pomiar kinetyki inkorporacji ^{35}S -metioniny do tzw. całkowitej frakcji białek syntetyzowanych przez rybosom (tj. nowo-syntetyzowanych jak i uwolnionych) (pełne symbole) i frakcji białek uwolnionych z rybosomów (symbole otwarte). „*Half transit time*” ($T_{1/2}$) określono na podstawie przesunięcia między dwiema liniami, wykorzystując analizę regresji liniowej. „*Half transit time*” określony dla szczepu dzikiego (A), uL10 $_{\Delta h2}$ (B) i uL10 $_{\Delta h1h2}$ (C) oraz dla szczepu dzikiego w obecności 50 ng/ml CHX. (D) Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów.

W przeprowadzonym układzie eksperymentalnym, jako kontrolę zastosowano komórki szczepu dzikiego traktowane niskim stężeniem cykloheksymidu (CHX, 50 ng/ml), który jest antybiotykiem bezpośrednio działającym na proces elongacji. Zastosowane stężenie 50 ng/ml CHX powoduje spadek wydajności translacji o ok. 35% (Fig. 26). Wynik ten jest podobny do danych otrzymanych w analizie ogólnej dynamiki translacji mierzonej inkorporacją ^{35}S -Met dla mutantu uL10 $_{\Delta h1h2}$

(Fig. 24). Ponadto wykazano, że „half transit time” dla komórek szczepu dzikiego traktowanych niskim stężeniem CHX znacznie się wydłużył. Potwierdza to jednocześnie, że CHX blokuje etap elongacji w cyklu translacyjnym, a ponadto waliduje zastosowany układ eksperymentalny (Fig. 25D). Zatem, wykonana analiza „half transit time” z wykorzystaniem mutantów drożdżowych wykazała, że proces elongacji/terminacji nie jest zaburzony. Rybosomy zubożone o białka P1/P2, czy to brak jednej pary P1B-P2A czy wszystkich dimerów białek P (P1A-P2B i P1B-P2A), prowadzą etap elongacji w cyklu translacyjnym w warunkach *in vivo* w takim samym stopniu jak rybosomy komórek szczepu dzikiego. Należy wspomnieć, że zastosowane stężenie 50 ng/ml cykloheksymidu nie powoduje zmian w wydajności procesu translacji w przypadku mutantu uL10 Δ h1h2 (Fig. 26).

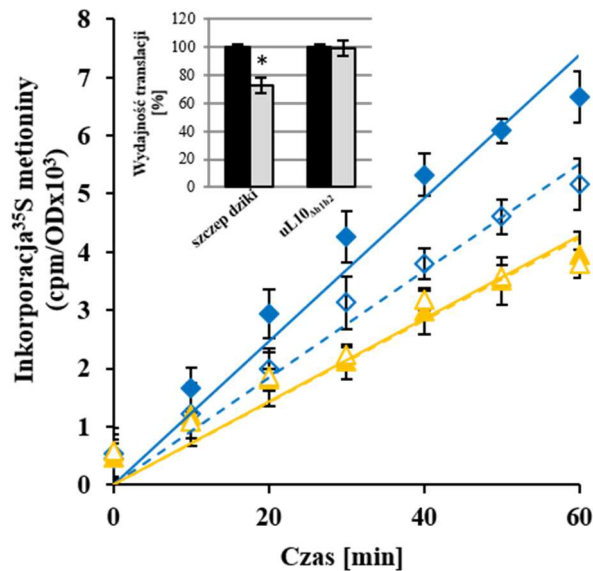


Fig. 26. Analiza wydajności procesu translacji badanych szczepów drożdżowych w obecności cykloheksymidu. Pomiar wydajności translacji wykonano na drodze analizy kinetyki wbudowywania ³⁵S-metioniny do nowo syntetyzowanych polipeptydów w komórkach szczepu dzikiego +CHX w stężeniu 50 ng/ml (◆) i -CHX (◇) oraz komórek mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2 +CHX w stężeniu 50 ng/ml (▲) i -CHX (△). Błąd pomiaru przedstawiono jako odchylenia standardowe, wykorzystano dane z trzech niezależnych eksperymentów. Wstawka przedstawia normalizację uzyskanych wyników wydajności translacji mutantów w stosunku do wydajności translacji komórek kontrolnych szczepu dzikiego oraz komórek mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2 wyrażone jako 100%. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie przy $P < 0,01$ określone za pomocą t Studenta.

2.2. Analiza jakościowa procesu translacji - analiza polisomów

Centralnym elementem maszynerii translacyjnej jest rybosom. Zbudowany jest on z mniejszej 40S i większej 60S podjednostki rybosomalnej, które w procesie inicjacji tworzą funkcjonalny układ 80S zaangażowany w proces translacji. Ocena tzw. kondycji maszynerii translacyjnej, to nie tylko analiza wydajności translacji, jak na przykład „*half transit time*”, ale jedną z najistotniejszych metod analitycznych to ocena frakcji poszczególnych elementów maszynerii translacyjnej, jaką jest analiza profilu polisomów. Technika ta pozwala na ilościowe oznaczenie poziomu poszczególnych podjednostek rybosomalnych: 40S, 60S oraz pełnych rybosomów 80S, tzw. monosomów, które tworzą dwie frakcje; pierwsza to translacyjnie aktywne rybosomy 80S w kompleksie z mRNA, druga zaś to tzw. wolne rybosomy 80S (ang. „*vacant ribosomes*”), które nie są zaangażowane w translację i stanowią pulę spoczynkowych rybosomów. Ponadto, w analizie profilu polisomów występuje frakcja polisomów, tj. rybosomów translacyjnie aktywnych w kompleksie z mRNA, na którym może znajdować się dwa i więcej rybosomów. Należy podkreślić, iż stan metaboliczny maszynerii translacyjnej w analizie profili polisomów jest utrwalony za pomocą antybiotyku jakim jest cykloheksymid. Antybiotyk ten blokuje proces translacji na etapie elongacji, co w konsekwencji prowadzi do „zamrożenia” maszynerii translacyjnej. Otrzymany profil polisomów jest obrazem statycznym maszynerii translacyjnej będący odzwierciedleniem stanu metabolicznego komórki. Wszelkie zmiany w profilu polisomów mogą wskazywać na zaburzenia na różnych etapach procesu translacji, włączając w to proces biogenezy rybosomów, poprzez inicjację, elongację i na terminacji kończąc. Zatem, analiza ta stanowi doskonałe narzędzie analityczne pozwalające na ocenę kondycji metabolicznej maszynerii translacyjnej. Wykorzystując mutanty drożdżowe oraz szczep BY4741 jako element referencyjny, wykonano analizy profili polisomów dla poszczególnych szczepów drożdżowych, co przyniosło zaskakujący wynik pokazując brak istotnych różnic w profilach. Wynik ten wskazuje, że perturbacje w obrębie kompleksu białek P nie wpływają znacząco na kondycję maszynerii translacyjnej na poszczególnych etapach translacji (Fig. 27 A, C, E). Zarówno określony stosunek podjednostek 40S do 60S (40S/60S), odzwierciedlający równowagę między produkcją poszczególnych podjednostek rybosomalnych wynoszący, odpowiednio: 0,79 dla szczepu dzikiego oraz dla mutantów 0,69 i 0,78

jak i stosunek polisomów do monosomu (P/M) nie były znacząco zmienione w żadnym z badanych szczepów drożdżowych.

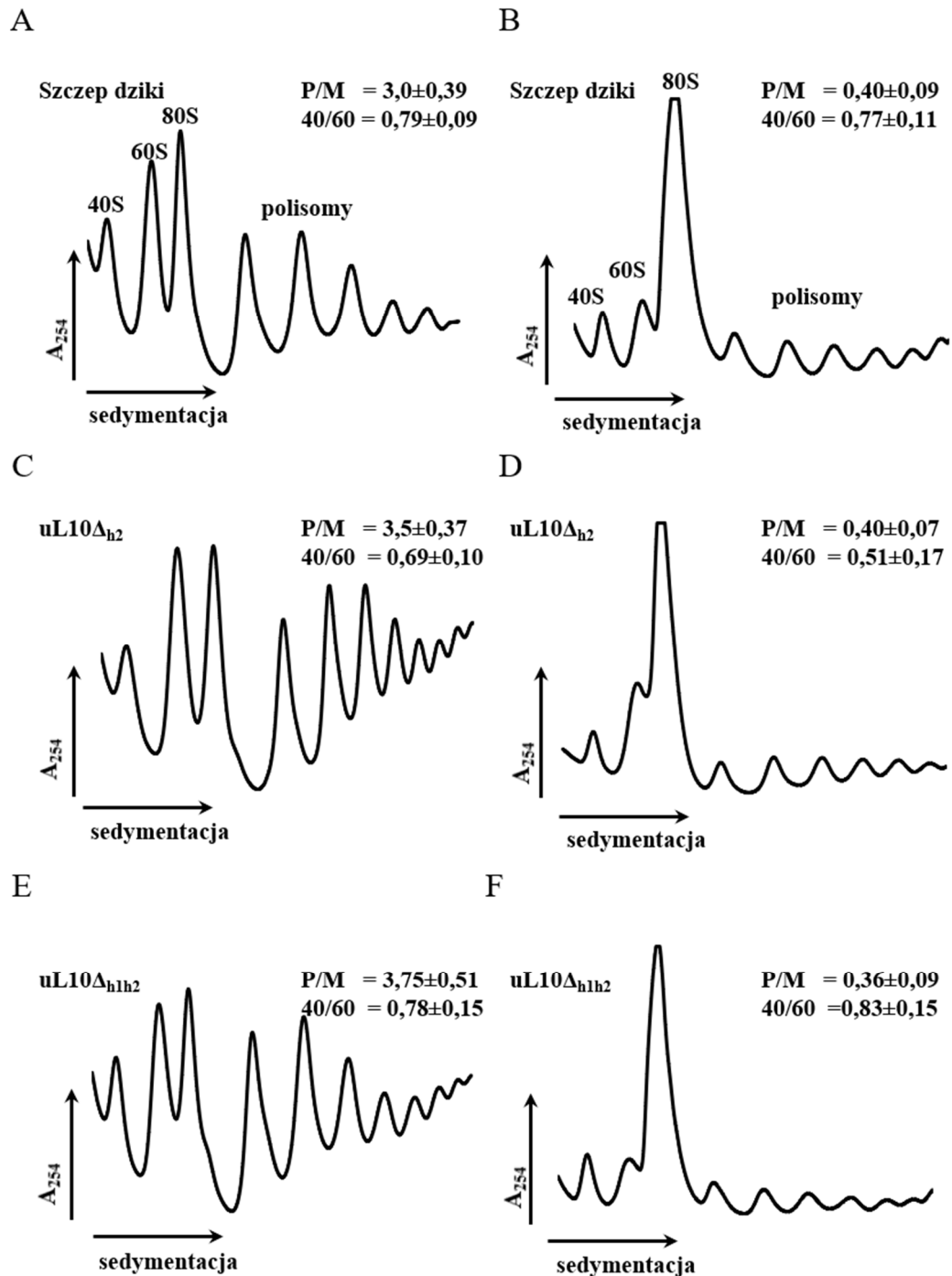


Fig. 27. Analiza profili polisomów w obecności i bez cykloheksymidu. A, C, E - + CHX; B, D, F - -CHX. Wstawki: P/M - stosunek polisomów do monosomu; 40/60 - stosunek podjednostki 40 do 60S

Dodatkowo wykonano analizę profili polisomów bez zastosowania cykloheksymidu, tzw. analiza „runoff”, umożliwiającą przede wszystkim ocenę aktywności maszynierii translacyjnej na etapie elongacji i terminacji. W tym wariancie doświadczenia,

również nie zaobserwowano istotnych różnic między szczepem kontrolnym a mutantami, wskazując że tempo elongacji/terminacji nie jest znacząco zmienione w mutantach drożdżowych (Fig. 27 B, D, F). Układem kontrolnym dla wykonanych analiz był eksperyment z CHX w niskim stężeniu (50ng/ml), który hamuje proces translacji w zakresie około 35%, jak wykazano w analizie wydajności procesu translacji (Fig. 28). Profil polisomów wskazał, że blokada elongacji za pośrednictwem CHX w niskim zakresie stężeń nie wpływa zasadniczo na obraz maszynierii translacyjnej, opisaney za pośrednictwem profilu polisomów. Analiza „runoff” w obecności 50 ng/ml CHX wskazała na niską, ale znaczącą blokadę translacyjnie aktywnych rybosomów w formie dobrze widocznej frakcji polisomalnej o wartości P/M 0,63 (Fig. 28). Zastosowane niskie stężenie (50 ng/ml) cykloheksymidu redukuje wydajność procesu translacji dla komórek szczepu dzikiego do poziomu obserwowanego dla komórek mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2 bez dodatku antybiotyku (Fig. 28). Ponadto, podobnie jak dla mutantu uL10 Δ h1h2 profil polisomów nie jest zmieniony. Jednakże, analiza „runoff” maszynierii translacyjnej dla mutantu uL10 Δ h1h2, w przeciwieństwie do szczepu dzikiego w obecności 50 ng/ml CHX nie wykazała znaczącej blokady na etapie elongacji.

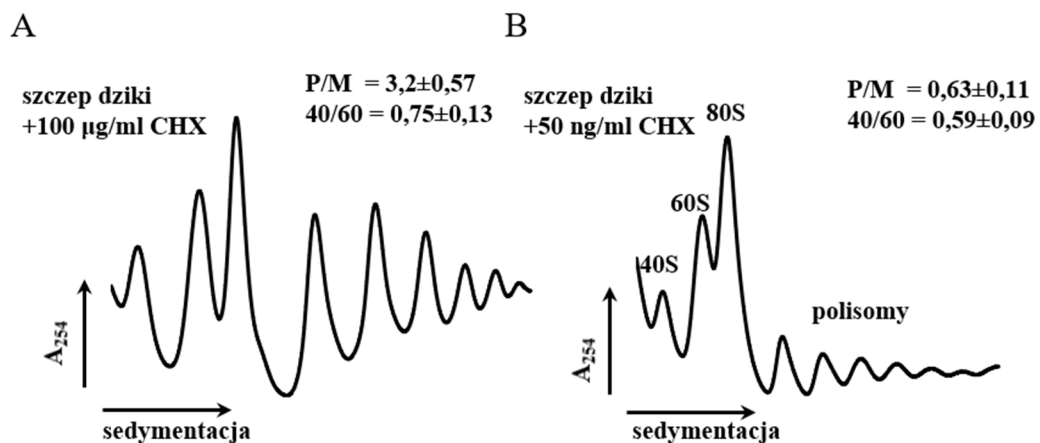


Fig. 27. Analiza profili polisomów w obecności 50 ng/ml cykloheksymidu. A: eksperyment kontrolny, +100 µg/ml CHX. B: „runoff”, +50ng/ml CHX. Wstawki: P/M - stosunek polisomów do monosomów, 40/60 – stosunek podjednostki 40 do 60S.

Wyniki te wskazały, że funkcjonowanie maszynierii translacyjnej na poszczególnych etapach translacji nie jest upośledzone w mutantach drożdżowych, niezależnie od rodzaju modyfikacji w obrębie centrum GTPazowego. Jednakże, jak wykazano wcześniej, mutant uL10 Δ h1h2 posiada znacznie obniżoną wydajności translacji.

W związku z tym faktem, przeanalizowano także profil polisomów w przeliczeniu na ilość komórek, aby porównać ilościowo frakcje rybosomalne w poszczególnych szczepach drożdżowych. W konsekwencji, obliczone całkowite pole powierzchni profili polisomów, pokazało, że mutant $uL10_{\Delta h1h2}$, posiada o 40% mniej frakcji polisomalnej w porównaniu do komórek szczepu dzikiego (Fig. 29). Analiza ta wskazała, że u podłoża mniejszej kinetyki translacji w mutancie $uL10_{\Delta h1h2}$ leży zmniejszona ilość translacyjnie aktywnych rybosomów, jednakże należy podkreślić, że nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic w profilach polisomów w odniesieniu do szczepu dzikiego. Zatem, analiza profili polisomów wskazała, że mutanty drożdżowe nie wykazują istotnych zaburzeń w funkcjonowaniu maszynery translacyjnej, biorąc pod uwagę biogenezę rybosomów, inicjację czy etapy elongacji i terminację. Jednakże, mutanty $uL10_{\Delta h2}$, a w szczególności $uL10_{\Delta h1h2}$, posiadają zmniejszoną ilość translacyjnie aktywnych rybosomów, co może wyjaśniać zaobserwowane zmniejszenie dynamiki translacji.

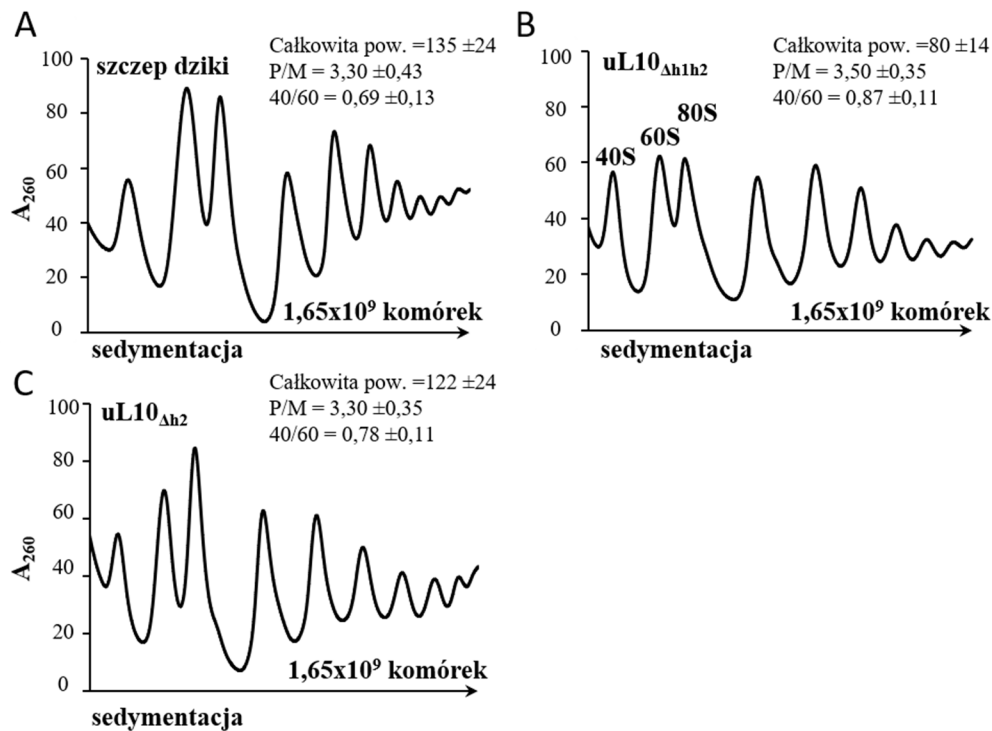


Fig. 29. Analiza profili polisomów badanych mutantów drożdżowych z wykorzystaniem zdefiniowanej ilości komórek drożdżowych. Analiza została wykonana z użyciem $1,65 \times 10^6$ komórek drożdżowych. Całkowitą powierzchnię obliczono dla wszystkich poszczególnych frakcji 40S, 60S, 80S i czterech frakcji polisomalnych. Pozostałe wartości, P/M i 40/60 opisują stosunek polisomów do monosomów oraz podjednostek rybosomalnych 40 do 60S.

2.3. Antybiotyki - molekularne sody w analizie funkcjonalnej procesu translacji

Przedstawione analizy, czy to analizy ilościowe wydajności translacji, czy też profile polisomów wykazały, że funkcjonowanie maszynerii translacyjnej w badanych mutantach drożdżowych nie jest znacząco zaburzone, na żadnym z poszczególnych etapów w cyklu translacyjnym, tj. w inicjacji, elongacji czy terminacji. Należy jednak podkreślić, że ogólna wydajność procesu translacji zwłaszcza dla mutantu uL10 Δ h1h2 jest znacząco obniżona. W konsekwencji, do dalszych analiz funkcjonalnych wykorzystano tzw. molekularne narzędzia, antybiotyki działające na rybosom, które można zaklasyfikować jako molekularne sondy w analizie funkcjonalnej rybosomu. Do analiz wykorzystano szeroki wachlarz antybiotyków. Zastosowano antybiotyki wpływające na poszczególne etapy procesu translacji. I tak, do analizy inicjacji wykorzystano harringtoninę (blokującą łączenie się podjednostek 40S i 60S) i laktinomycynę (blokującą tworzenie się pierwszego wiązania peptydowego); natomiast do badania elongacji: paromomycynę, higromycynę B, genetycynę (G418) (działającą na proces dekodowania procesu translacji) oraz sordarin i cykloheksymid (działające na etap translokacji w cyklu elongacyjnym). Ponadto, zastosowano diazaborynę blokującą proces biogenezy podjednostki 60S oraz aktynomycynę D hamującą syntezę rRNA. Pierwszy etap badań, to tzw. krążkowe testy wzrostowe. Mianowicie, na podłoże stałe YPD naniesiono zawiesinę komórek drożdżowych, a następnie umieszczano krążki z bibuły nasączone odpowiednim antybiotykiem. Płytki hodowano przez 72 godziny, temperaturze 30 °C i analizowano wrażliwość na antybiotyki mutantów drożdżowych, w formie analiz stref zahamowania wzrostu, w porównaniu do komórek kontrolnych (Fig. 30 i 31).

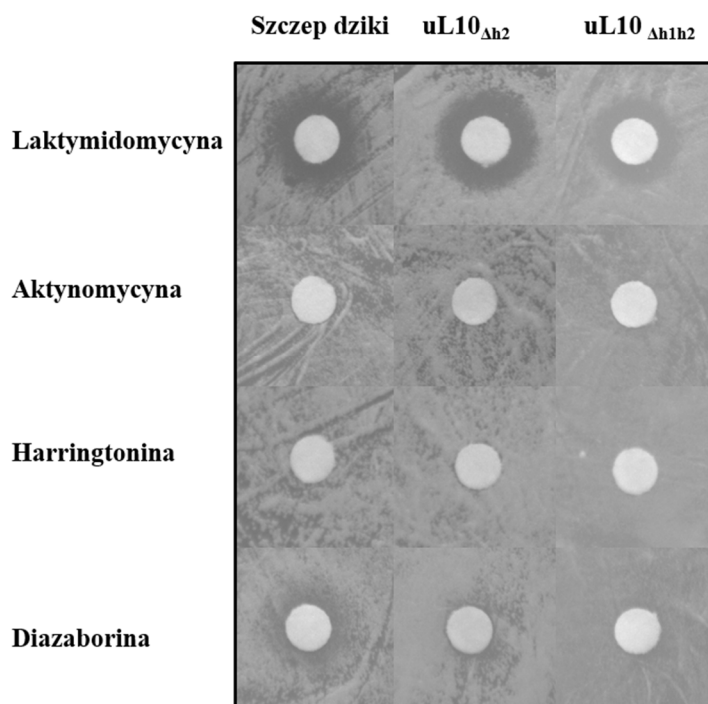


Fig. 30. Wpływ antybiotyków na wzrost komórek badanych mutantów drożdżowych. Na podłoże stałe YPD naniesiono zawiesinę komórek drożdżowych (o gęstości optycznej $OD_{600} = 0,5$) a następnie umieszczano krążek bibuły 3MM nasączony poszczególnymi antybiotykami: laktimidomycyna (0,2 mg/ml), aktynomycyną D (1 mg/ml), harringtoniną (10 mg/ml), diazaboryną (12,4 μ g/ml). Płytkę z podłożem stałym YPD inkubowano 72 godziny w temperaturze 30 °C.

Najistotniejsze zaburzenia we wzroście poszczególnych szczepów drożdżowych, a przede wszystkim uL10 Δ h1h2, zaobserwowano dla antybiotyków z grupy aminoglikozydów, do których należą paromomycyna (Par), genetycyna (G418) i higromycyna B (HigB). Aminoglikozydy to antybiotyki działające na wczesny etap elongacji w cyklu translacyjnym tj. proces dekodowania informacji genetycznej. Antybiotyki tej grupy łączą się z rybosomu w centrum dekodującym, co upośledza działanie rybosomu w ten sposób, że obniża precyzję dekodowania informacji genetycznej. Ponadto, zaobserwowano, że szczep drożdżowy uL10 Δ h1h2 wykazuje zmniejszoną wrażliwość na cykloheksymid (CHX) oraz sordarin (Sor). Uważa się, że antybiotyki te blokują proces translacji na etapie elongacji, a przede wszystkim hamują translokację rybosomu na mRNA.

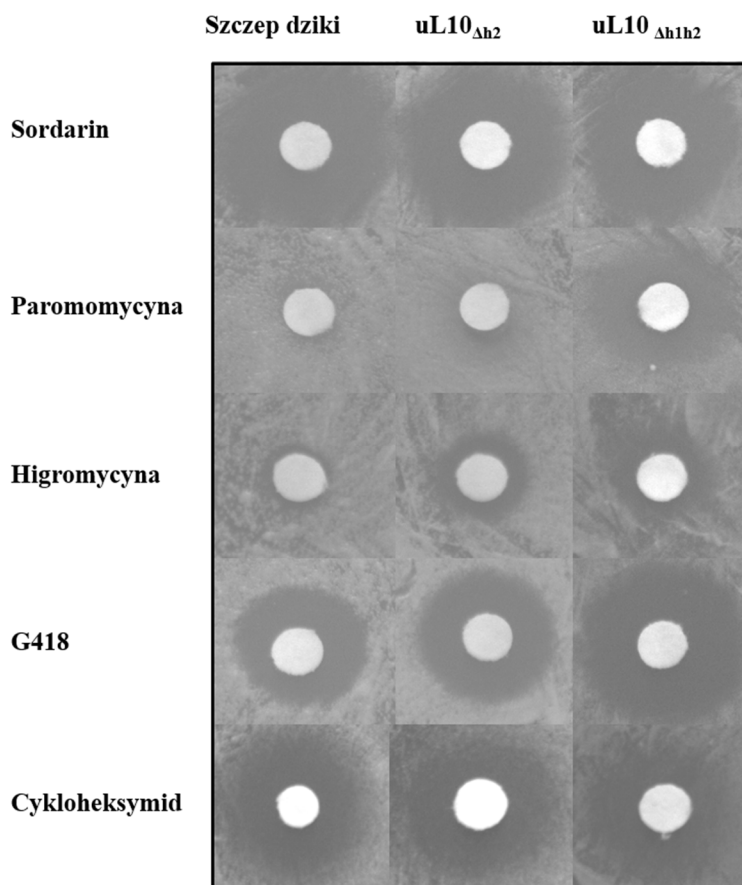


Fig. 31. Wpływ antybiotyków na wzrost komórek badanych mutantów drożdżowych. Na podłoże stałe YPD naniesiono zawiesinę komórek drożdżowych (o gęstości optycznej $OD_{600} = 0,5$) a następnie umieszczano krążek bibuły 3MM nasączony poszczególnymi antybiotykami: sordarinem (1mg/ml), paromomycyną (250 mg/ml), higromycyną B (15 mg/ml), genetycyną (G418) (50 mg/ml), cykloheksymidem (100 μ g/ml). Płytkę z podłożem stałym YPD inkubowano 3 dni w temperaturze 30 °C.

W celu szczegółowej analizy wpływu antybiotyków, a w szczególności z grupy aminoglikozydów oraz sordarinu czy cykloheksymidu na wzrost komórek badanych szczepów drożdżowych, wykonano dodatkowe testy wzrostowe. Mianowicie, podłoże stałe YPD suplementowano odpowiednim antybiotykiem, a komórki drożdżowe nanoszono w formie kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny o gęstości optycznej $OD_{600}=0,1$. Drożdże hodowano przez trzy dni w temperaturze 30 °C. Wykonane analizy wzrostowe potwierdziły negatywny wpływ tych antybiotyków na wzrost komórek mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2} (Fig. 32A, górny panel). Wyniki te sugerują, że brak białek P może mieć wpływ na etap dekodowania informacji genetycznej. Na uwagę także zasługują testy wzrostowe wykonane w obecności sordarinu. Zaobserwowano zahamowanie wzrostu komórek

szczepu kontrolnego, zaś mutanty drożdżowe wykazywały znaczącą oporność na ten antybiotyk (Fig. 32A, dolny panel). Sordarin jest uważany za inhibitor działający na translokację rybosomu, na etapie elongacji, procesu zależnego od czynnika translacyjnego eEF2, który ulega bezpośredniej interakcji z białkami P [63], jednakże jego działanie nie jest precyzyjnie określone. Ponadto, zmutowane szczepy uL10 Δ h2 i uL10 Δ h1h2 wykazywały podwyższoną oporność na cykloheksymid, także inhibitor translokacji, ale o dobrze zdefiniowanym działaniu (Fig. 32A, dolny panel).

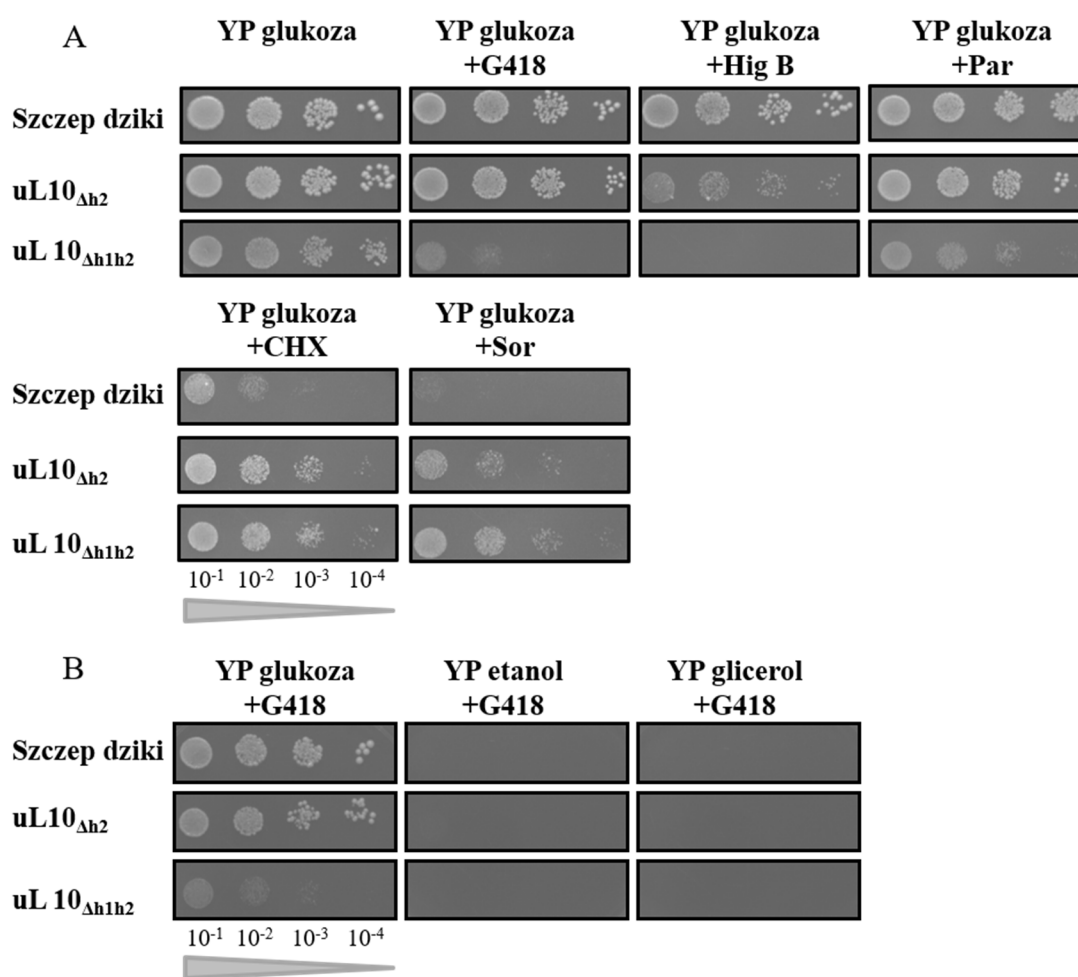


Fig. 32. Test wzrostowe w obecności antybiotyków aminoglikozydowych oraz sordarinu i cykloheksymidu. Testy wzrostowe wykonano na pożywce YP suplementowanej różnymi źródłami węgla oraz dodatkowo odpowiednim antybiotykiem. A: Zawiesinę komórek drożdżowych o gęstości optycznej OD₆₀₀=0,1 naniesiono w formie kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń na podłoże stałe YP uzupełnione glukozą oraz 100 µg/ml G418, 100 µg/ml Hyg B, 250 µg/ml Par, 0,1 µg/ml CHX i 2 µg/ml Sor, B: testy wzrostowe, j. w. na podłożu stałym YP suplementowanym glukożą, etanolem lub glicerolem oraz dodatkowo 100 µg/ml G418. Poszczególne rozcieńczenia to: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, jak pokazano na rysunku.

Wyniki te mogą sugerować, że białka P mogą odgrywać istotną rolę w procesie elongacji przede wszystkim na etapie nie tylko dekodowania informacji genetycznej, lecz również na etapie translokacji.

Analizy wzrostowe w obecności antybiotyków aminoglikozydowych rozszerzono o analizy wzrostu komórek drożdżowych na tzw. niefermentowalnych źródłach węgla, jak etanol czy glicerol. Związki te są efektywnie wykorzystywane przez komórki drożdżowe jako źródło energii, ale ich wykorzystanie wymaga przeprogramowania metabolizmu, w stosunku do glukozy, która jest preferowanym źródłem węgla dla drożdży. Analizę wykonano w obecności antybiotyku G418, który w stężeniu 100 µg/ml nie jest letalny dla komórek kontrolnych. Jak pokazały wcześniejsze analizy fenotypowe, komórki kontrolne w przeciwieństwie do mutantów, wykorzystują takie źródła węgla jak etanol czy glicerol (Fig. 18). Zaskakujące dane uzyskano z analiz testów wzrostowych w obecności niefermentowalnych źródeł węgla tj. etanolu czy glicerolu oraz w obecności G418. Jak pokazano wcześniej komórki mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2} nie są w stanie wykorzystać niefermentowalnych źródeł węgla jak etanol czy glicerol, a wzrost w obecności G418 jest zahamowany. Natomiast komórki szczepu dzikiego w obecności niefermentowalnych źródeł węgla oraz G418 także tracą zdolność do wykorzystania etanolu i glicerolu, odzwierciedlając fenotyp komórek szczepu uL10_{Δh1h2} hodowanego na pożywce na bazie tych źródeł węgla (Fig. 32B).

Dalsze rozwinięcie prowadzonych badań związanych z wykorzystaniem antybiotyków to analiza wydajności procesu translacji w obecności G418 oraz sordarinu, wykorzystując inkorporację znakowanej radioaktywnie metioniny ³⁵S-Met do nowo syntetyzowanego białka w obecności tzw. subletalnego (100 µg/ml) stężenia G418 oraz 0,5 µg/ml sordarinu, dla komórek szczepu dzikiego oraz mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2} (Fig. 33A i Fig. 34A).

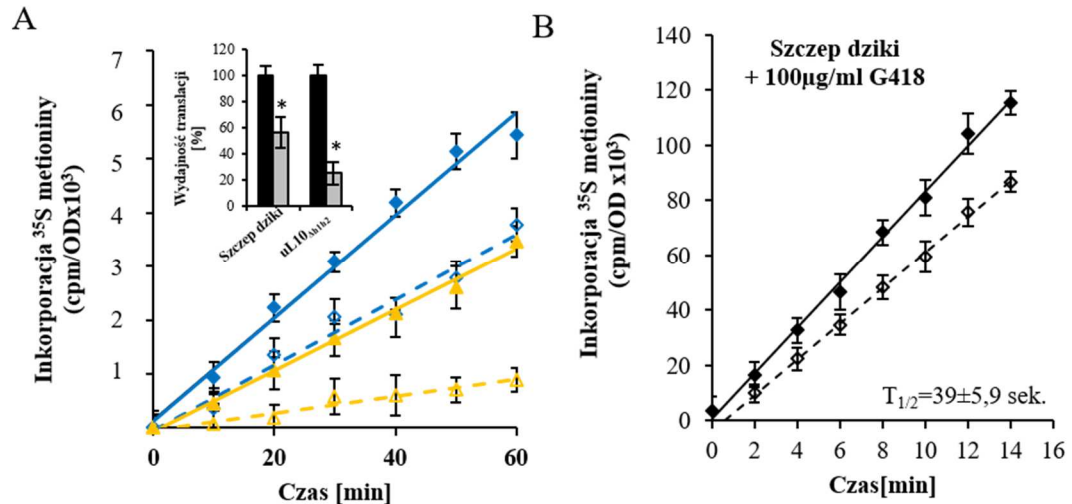


Fig. 33. Analiza wydajności procesu translacji w obecności G418. Analizę wydajności procesu translacji określono jako funkcja inkorporacji ^{35}S -metioniny do nowo syntetyzowanych polipeptydów w obecności subletalnej dawki G418 (100 $\mu\text{g/ml}$), w czasie hodowli. A: analiza ogólnej wydajności translacji; kolorem niebieskim oznaczono dane dotyczące szczepu dzikiego +G418 w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ (◇) i -G418 (◆) oraz kolorem żółtym oznaczono dane dla mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2} +G418 w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ (Δ) i -G418 (▲). Błędy reprezentują odchylenia standardowe uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów. Wstawka przedstawia znormalizowane wyniki wydajności translacyjnej komórek szczepu dzikiego oraz komórek mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2} nietraktowanych G418 wyrażone jako 100%, w stosunku do wydajności translacji komórek szczepu dzikiego oraz komórek mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2}, * - istotność statystyczna $P < 0,01$, test t Studenta. B: Analiza $T_{1/2}$ - tzw. *half transit time*, wykonano z wykorzystaniem szczepu dzikiego w obecności 100 $\mu\text{g/ml}$ antybiotyku G418.

Analiza wydajności translacji wskazała na 40% (w obecności G418) oraz 60% (w obecności sordarinu) zmniejszenie wydajności tego procesu w przypadku komórek szczepu dzikiego oraz 80% (w obecności G418) oraz 20% (w obecności sordarinu) dla komórek mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2}.

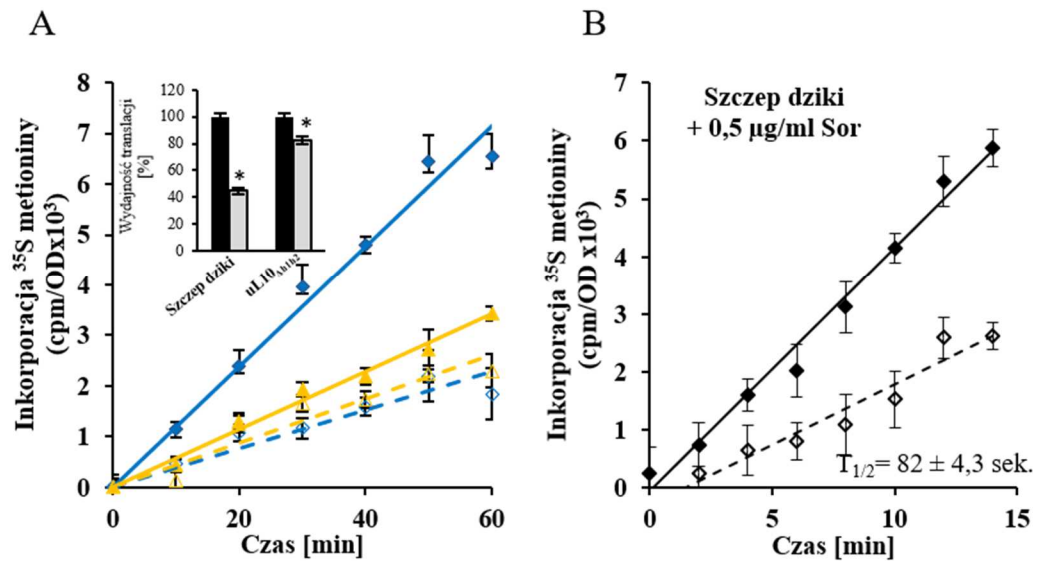


Fig. 34. Analiza wydajności procesu translacji w obecności sordarinu w badanych szczepach drożdżowych. A: Analiza wydajności procesu translacji określona jako funkcja wbudowywania ^{35}S metioniny do nowo syntetyzowanych polipeptydów w obecności 0,5 $\mu\text{g/ml}$ sordarinu, na czas hodowli Kolorem niebieskim oznaczono dane dotyczące szczepu dzikiego +Sor w stężeniu 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ($\diamond$) i -sordarinu ($\blacklozenge$) oraz kolorem żółtym dane dla mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2 +sordarinu w stężeniu 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Δ) i -0,5 $\mu\text{g/ml}$ ($\blacktriangle$). Błędy reprezentują odchylenia standardowe uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów. Wstawka przedstawia znormalizowane wyniki wydajności translacyjnej komórek szczepu dzikiego oraz komórek mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2 nietraktowanych sordarinem wyrażone jako 100%, w stosunku do wydajności translacji komórek szczepu dzikiego oraz komórek mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2 w obecności sordarinu,; * - istotność statystyczna $P < 0,01$, test t Studenta. B: Analiza *half transit time* dla szczepu dzikiego w obecności 0,5 $\mu\text{g/ml}$ sordarinu.

Na szczególną uwagę zasługuje analiza $T_{1/2}$, „*half transit time*”, mierząca wydajność etapu elongacji i terminacji. Analizę tę wykonano dla komórek szczepu dzikiego w obecności 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 oraz 0,5 $\mu\text{g/ml}$ sordarinu, w celu bliższego scharakteryzowania działania tych antybiotyków pod względem oddziaływania metabolicznego na maszynę translacyjną *in vivo*. W przypadku G418 $T_{1/2}$ nie znacznie wzrosło do 39s (wzrost o 20%) (Fig. 33B), w stosunku do około 32s dla komórek kontrolnych (Fig. 25). W przypadku $T_{1/2}$ mierzonego w obecności sordarinu zanotowano wzrost aż do 89s (Fig. 34B). Sordarin jest postrzegany jako związek blokujący translokację na etapie elongacji łańcucha polipeptydowego, co analiza ta jednoznacznie pokazała. Odmienny wpływ

ma aminoglikozyd G418, którego działanie nie wpływa znacząco na etap elongacji procesu translacji.

W kolejnym kroku analiz podjęto próbę charakterystyki funkcjonowania maszynerii translacyjnej w obecności G418 i sordarinu, przeprowadzając analizę profili polisomów z wykorzystaniem mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2, jak i szczepu kontrolnego. W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę wykorzystując antybiotyki sordarin. Analizy strukturalne oraz szereg prac funkcjonalnych wskazały, że antybiotyk ten oddziałuje z centrum GTPazowym, a przede wszystkim z czynnikiem elongacyjnym EF2 [63, 147]. Postuluje się również, że rybosomalne białko uL10 jest zaangażowane w interakcję sordarinu z rybosomem [148, 149]. Wykonana analiza $T_{1/2}$ wykazała, że faktycznie antybiotyk ten znacząco obniża etap elongacji/terminacji a zatem jego efekt powinien być dobrze widoczny na obrazie polisomów, analogicznie do efektu wywoływanego przez CHX. Analiza profili polisomów w obecności sordarinu wskazała, że w szczepie kontrolnym następuje akumulacja monosomów 80S oraz znaczne zmniejszenie frakcji polisomów w stosunku do analizy kontrolnej z wykorzystaniem CHX; zaś stosunek podjednostek 40/60 nie uległ znaczącej zmianie w stosunku do kontroli. Zaskakujące wyniki otrzymano w przypadku mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2, w obecności sordarinu. Profil polisomów przypomina profil dla układu kontrolnego z CHX, tj. frakcja polisomów jest wyraźna, z tą różnicą że wartość P/M jest mniejsza; ponadto stosunek 40/60 ulega zmianie, co sugeruje zaburzenia w procesie inicjacji czy też biogenezy podjednostki 60S. (Fig. 35). Podsumowując, otrzymane wyniki wskazywały, że sordarin nie blokuje procesu elongacji w komórkach szczepu dzikiego (brak frakcji polisomów). Zachowanie się maszynerii translacyjnej w mutancie drożdżowym uL10 Δ h1h2, który wykazuje oporność na ten antybiotyk, wskazuje że proces elongacji może przebiegać wydajnie (obecność frakcji polisomów).

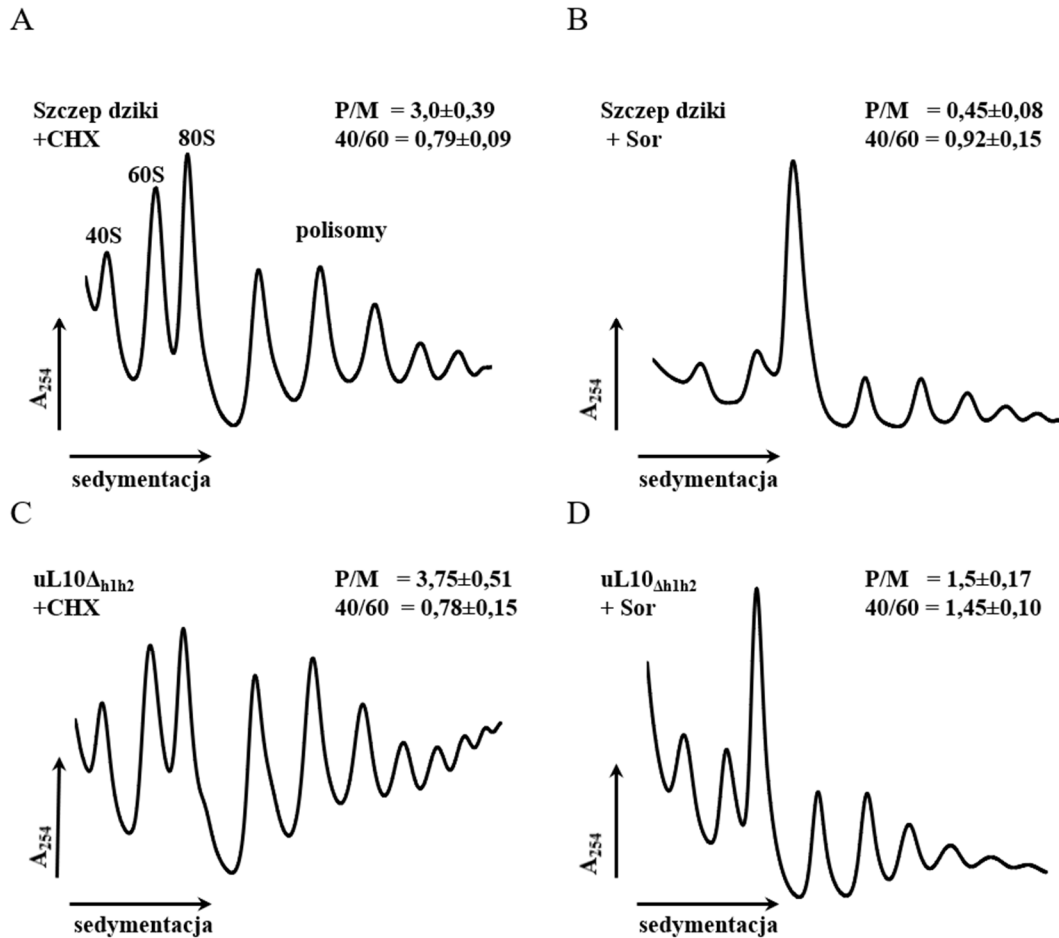


Fig. 35. Analiza profili polisomów w obecności sordarinu. Analiza profili polisomów w obecności cykloheksymidu (CHX) - układ kontrolny (A, C) oraz sordarinu (B, D). Stosunek polisomów do monosomu (P/M) obliczono dla każdego profilu przez podzielenie obszaru pierwszych czterech pików polisomalnych przez obszar frakcji dla monosomu 80S.

W związku z zaobserwowanym intrygującym zachowaniem się badanych komórek drożdżowych w obecności sordarinu, wykonano dodatkową analizę profili polisomów w obecności tego inhibitora i jednocześnie w obecności cykloheksymidu, który jest antybiotykiem wydajnie blokującym translację na etapie elongacji (dobrze widoczne polisomy). Jak wykazano w szczepie kontrolnym, w analizowanych profilach polisomów następuje akumulacja frakcji monosomów 80S, przy braku frakcji polisomów, zaś stosunek 40S/60S jest podobny jak w układzie kontrolnym (Fig. 36B). Ponadto, analiza wykonana z wykorzystaniem mutantu drożdżowego uL10 Δ_{h1h2} przyniosła zaskakujące wyniki, pokazując profil polisomów z dobrze zachowaną frakcją polisomów (Fig. 36D). Przeprowadzone analizy mogą wskazywać, że maszyna translacyjna w komórkach mutantu uL10 Δ_{h1h2} nie jest

w pełni blokowana przez sordarin, co może tłumaczyć niską wrażliwość na ten antybiotyk. W przypadku komórek kontrolnych, obecność frakcji 80S może wskazywać że blokada działania rybosomu może następować na etapie rekrutacji nieaktywnych monosomów 80S do procesu translacji. Zjawisko to nigdy nie było powiązane z aktywnością sordarinu.

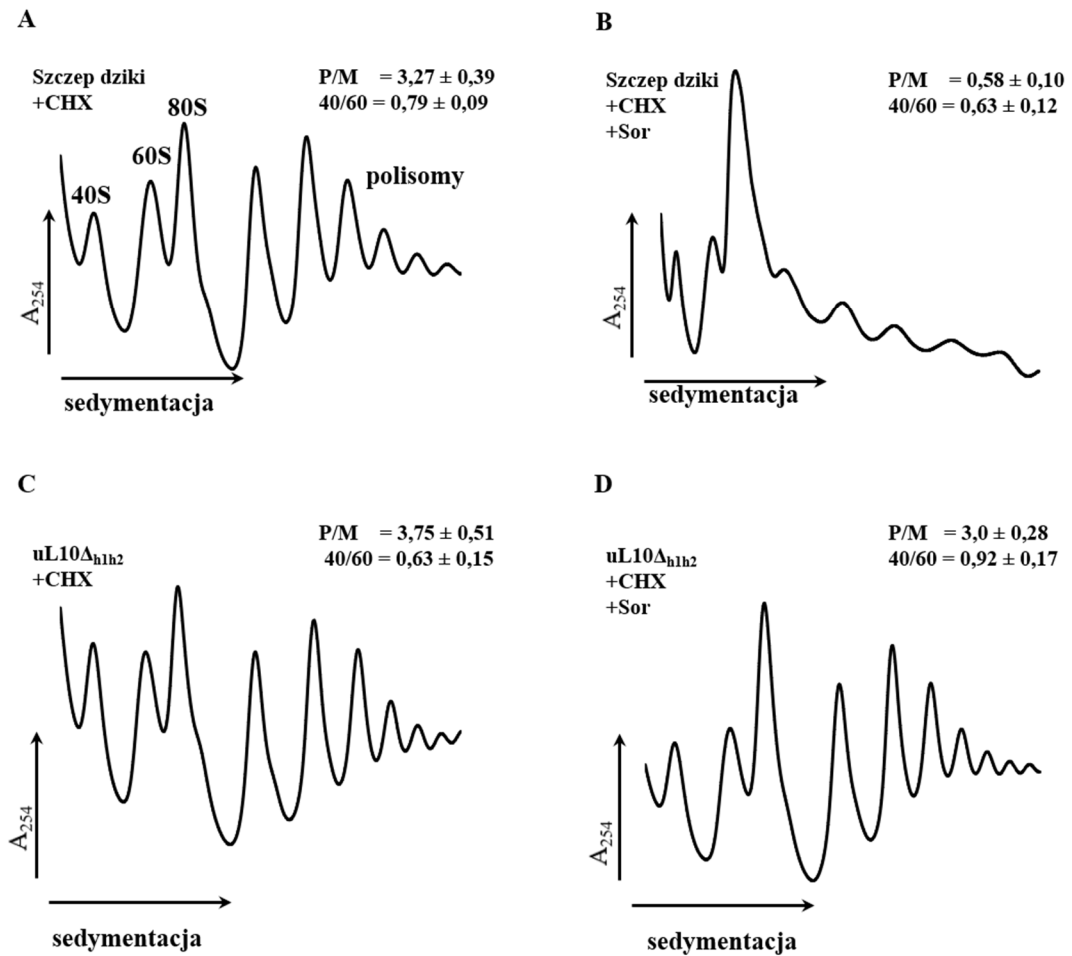


Fig. 36. Analiza profili polisomów w obecności sordarinu i cykloheksymidu. Analiza profili polisomów w obecności cykloheksymidu (A, C) oraz sordarinu i cykloheksymidu (B, D). Stosunek polisomów do monosomu (P/M) obliczono dla każdego profilu jako stosunek obszaru pierwszych czterech pików polisomalnych do obszaru frakcji dla monosomu 80S.

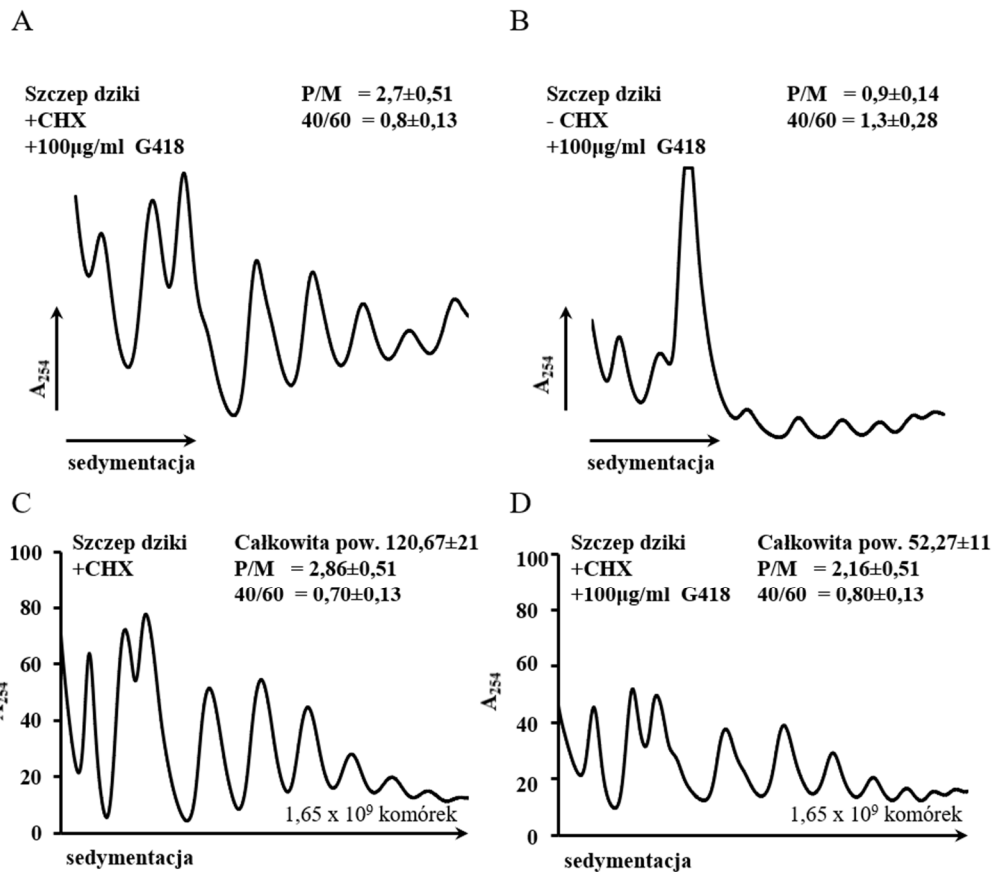


Fig. 37. Analiza polisomów w obecności G418 wykorzystując kontrolny szczep drożdżowy. A: Profil polisomów dla komórek szczepu dzikiego hodowanych w obecności 100 µg/ml G418 i zablokowanych translacyjnie przez CHX. B: Profil polisomów w warunkach „runoff” w obecności 100 µg/ml G418. C i D: Profile polisomów uzyskany przy użyciu $1,65 \times 10^9$ komórek drożdżowych w obecności lub braku G418. Całkowitą powierzchnie obliczono dla wszystkich poszczególnych frakcji 40S, 60S, 80S i czterech frakcji polisomalnych. Pozostałe wartości, P/M i 40/60 opisują stosunek polisomów do monosomów oraz podjednostek rybosomalnych 40 do 60S.

W kolejnym kroku, z racji na zaobserwowanie synergistycznego działania G418 w mutancie uL10 Δ h1h2, oraz analogiczne działanie tego antybiotyku na szczep kontrolny, przeanalizowano wpływ tego antybiotyku na maszynierę translacyjną w komórkach szczepu kontrolnego. Analiza polisomów w obecności G418 wykazała, że w obecności tego antybiotyku profil polisomów nie odbiega znacząco od układu kontrolnego, z taką różnicą, że wartość P/M zmniejszyła się wskazując, że ilość rybosomów zaangażowanych w translację spadła (Fig. 37). Analiza profili polisomów w tzw. eksperymencie „runoff” w obecności 100 µg/ml G418 wykazała brak frakcji polisomalnej oraz akumulację monosomów 80S, podobnie jak w układzie kontrolnym (Fig. 27B). Ponadto, w analizie wydajności translacji

w obecności G418 zaobserwowano spadek wydajności tego procesu. Przypomina to zachowanie zaobserwowane w komórkach mutantu drożdżowego uL10 Δ h1h2. Zatem, dodatkowo porównano profile polisomów uzyskane przy użyciu jednakowej liczby komórek szczepu dzikiego w obecności lub braku G418. Obliczone całkowite pole powierzchni polisomów, dla komórek szczepu dzikiego hodowanych w obecności G418, wykazuje o 60% mniejszą frakcję rybosomalną niż pole powierzchni polisomów dla komórek nietraktowanych G418 (Fig. 37). Zatem, obniżenie wydajności translacji związane jest z obniżeniem ilości rybosomów w komórce drożdżowej. Podsumowując, działanie antybiotyku G418 na szczep kontrolny z grupy aminoglikozydów nie upośledza znacząco poszczególnych etapów translacji realizowanych przez rybosom, podobnie do zachowania się maszynarii translacyjnej w mutancie uL10 Δ h1h2.

3. WPŁYW RYBOSOMALNYCH BIAŁEK P NA PRECYZJĘ DEKODOWANIA INFORMACJI GENETYCZNEJ PRZEZ RYBOSOM EUKARIOTYCZNY

Nadwrażliwość komórek mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2} na działanie antybiotyków aminoglikozydowych sugeruje, że białka P na rybosomie eukariotycznym mogą odgrywać istotne znaczenie w procesie dekodowania informacji genetycznej. Podjęto więc próbę określenia stopnia dokładności dekodowania informacji genetycznej przez maszynę translacyjną w kontekście zaburzeń w konfiguracji białek P na rybosomie. Analizy te wykonano wykorzystując system dwóch lucyferaz jako układ reporterowy („*Dual Luciferase Assay Reporter System*”) – „*renilla*” i „*firefly*”. W tym układzie eksperymentalnym, sekwencje DNA kodujące obie lucyferazy występują w fuzji dwóch genów podlegające konstytutywnej ekspresji na bazie, której syntetyzowane jest pojedyncze białko hybrydowe o aktywności dwóch lucyferaz. Każda z lucyferaz wykazuje charakterystyczną aktywność i po dodaniu specyficznego substratu jest zdolna do emisji bioluminescencji, której poziom można oznaczyć za pomocą luminometru. System analityczny mierzący precyzję dekodowania „*misincorporation*” polega na tym, że w genie kodującym lucyferazę „*firefly*”, w miejscu decydującym o katalitycznej aktywności tego enzymu, wprowadzona jest mutacja, czyniąca enzym nie aktywnym. W takim układzie eksperymentalnym odzyskanie aktywności katalitycznej lucyferazy jest możliwe w wyniku pomyłkowego odczytu informacji przez rybosom w genie dla lucyferazy „*firefly*”. Zatem, poziom mierzonego sygnału pochodzącego od lucyferazy „*firefly*” jest miarą częstości mylenia się rybosomu typu, ang. „*misincorporation*” – wprowadzenie błędnego aminokwasu. W analizie „*misincorporation*” zastosowano kilka układów eksperymentalnych na bazie dwóch typów kodonów. Pierwszy układ to mutacja w pozycji 245 w genie dla lucyferazy „*firefly*”, tj. kodon CAC kodujący histydynę, jest zastąpiony tzw. kodonem semi-komplementarnym CGC (kodon kodujący argininę) lub CAG (kodon kodujący glutaminę). Dodatkowo użyto układu analitycznego, gdzie mutacja w genie dla lucyferazy „*firefly*” występuje w pozycji 218, jest to semi-komplementarny kodon AGC (kodon kodujący serynę). W teście „*Dual Luciferase Assay Reporter System*” jako kontrolę użyto układy eksperymentalne, które zawierały kodony nie-komplementarne w pozycji 245 lub 218. Ponadto, wykorzystano komplementarny test pozwalający na ocenę częstości mylenia się rybosomu,

polegający na pomiarze częstotliwości supresji przedwczesnego kodonu stop (ang. „*read-through*”). W tym przypadku między dwoma genami dla lucyferaz „*renilla*” i „*firefly*” znajduje się sekwencja **UGAC**, zawierająca sygnał STOP. Zatem, synteza aktywnej lucyferazy „*firefly*” jest wynikiem pomyłki rybosomu typu ang. „*read-through*”.

Ważnym parametrem w dekodowaniu informacji genetycznej przez rybosom jest tzw. przesunięcie ramki odczytu w czasie odczytu przez rybosom mRNA o jeden nukleotyd w kierunku 5' (-1, ang. „*frameshifting*”) lub 3' (+1, ang. „*frameshifting*”). Do oceny tendencji rybosomu do zmiany ramki odczytu tzw. -1 „*frameshifting*” posłużono się konstruktem genetycznym, w którym między dwiema lucyferazami znajdowała się sekwencja nukleotydowa pochodząca z wirusa L-A promująca zmianę ramki odczytu typu -1. Ponadto, wykorzystano także konstrukt genetyczny, który zawierał w tym miejscu sekwencję nukleotydową promującą zmianę ramki odczytu typu +1 pochodzącą z retrotranspozonu Ty1. W obu przypadkach, rybosom odczytuje gen lucyferazy „*firefly*” w prawidłowej ramce na skutek perturbacji w procesie translacji.

Pierwszy krok jaki został podjęty to walidacja systemu. W tym celu, wykonano analizę poprawności dekodowania informacji genetycznej przez rybosomy komórek szczepu dzikiego w obecności 100 oraz 200 µg/ml G418. Należy podkreślić, że antybiotyk ten stanowił istotne odniesienie dla analiz wykonanych z wykorzystaniem mutantu uL10_{Δh1h2}, ponieważ jak wykazano wcześniej, komórki szczepu dzikiego w obecności 100 µg/ml G418 naśladowały zachowanie się komórek mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2} (Fig. 32, 33 i 37). Użyto G418 w stężeniu 100 oraz w stężeniu 200 µg/ml, które wykazuje działanie letalne dla komórek drożdży. W teście „*misincorporation*” na bazie układów analitycznym z kodonami CGC₂₄₅ i CAG₂₄₅, wykazano znaczący wzrost pomyłek generowanych przez rybosom w obecności G418, a przede wszystkim w stężeniu 200 µg/ml. Podobny wynik otrzymano stosując układ na bazie kodonu AGC₂₁₈, w przypadku kodonów nie-komplementarnych, nie obserwowano wpływu G418 (Fig. 38). Jest to obserwacja prawidłowa, ponieważ antybiotyk ten modyfikuje dekodowanie informacji jedynie w przypadku odczytu tzw. kodonów semi-komplementarnych, które wykazują potencjał do interakcji z anty-kodonami o niskim stopniu podobieństwa (Fig. 38).

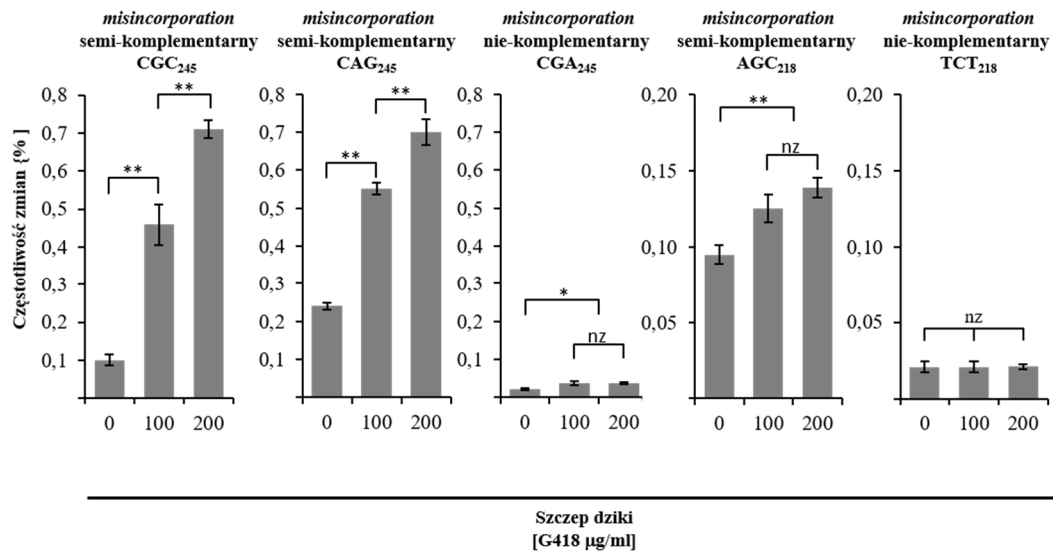


Fig. 38. Analiza „misincorporation” przy zastosowaniu układu reporterowego dwóch lucyferaz. Analizę wykonano stosując komórki szczepu dzikiego w obecności 100 oraz 200 µg/ml, G418. CGC₂₄₅, CAG₂₄₅ i AGC₂₁₈ opisują semi-komplementarne kodony w pozycjach 245 i 218 enzymu reporterowego lucyferazy „firefly”; CGA₂₄₅ i TCT₂₁₈ reprezentują nie komplementarne kodony w obrębie enzymu reporterowego lucyferazy „firefly”. Wszystkie dane są przedstawione jako procent aberracji translacji; słupki błęd reprezentują odchylenia standardowe. Istotność statystyczną różnic oceniano metodą jednokierunkowej analizy zmiennych (ANOVA), wspartej testem *post hoc* Tukey’a (HSD), wskazano gwiazdkami: *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$; nz, nie znaczący.

W następnym kroku przeanalizowano mutanty drożdżowe. W zależności od zastosowanego systemu, wykazano wzrost częstotliwość mylenia się rybosomu: 2-krotny w stosunku do szczepu kontrolnego w przypadku mutantu drożdżowego uL10_{Δh2} i ponad 3-krotny dla mutantu uL10_{Δh1h2} (Fig. 39). Zatem, otrzymane dane wskazały, że szczep drożdżowy, w którym rybosom pozbawiony jest wszystkich białek P, ma wysoką skłonność do błędnego odczytu tzw. kodonu semi-komplementarnego. Ponadto, efekt ten jest odwrotnie proporcjonalny do ilości białek P na rybosomie. Ponadto, można zauważyć korelację między poziomem błędów generowanych przez szczep uL10_{Δh1h2} a działaniem antybiotyku G418 w stężeniu 100 µg/ml. Zatem, na bazie otrzymanych wyników można stwierdzić, że zaburzenia w obrębie białek P wpływają na proces dekodowania informacji genetycznej przez rybosom, jednakże nie jest to prawdopodobnie efekt o działaniu bezpośrednim na centrum dekodujące, a raczej tzw. oddziaływanie allosteryczne.

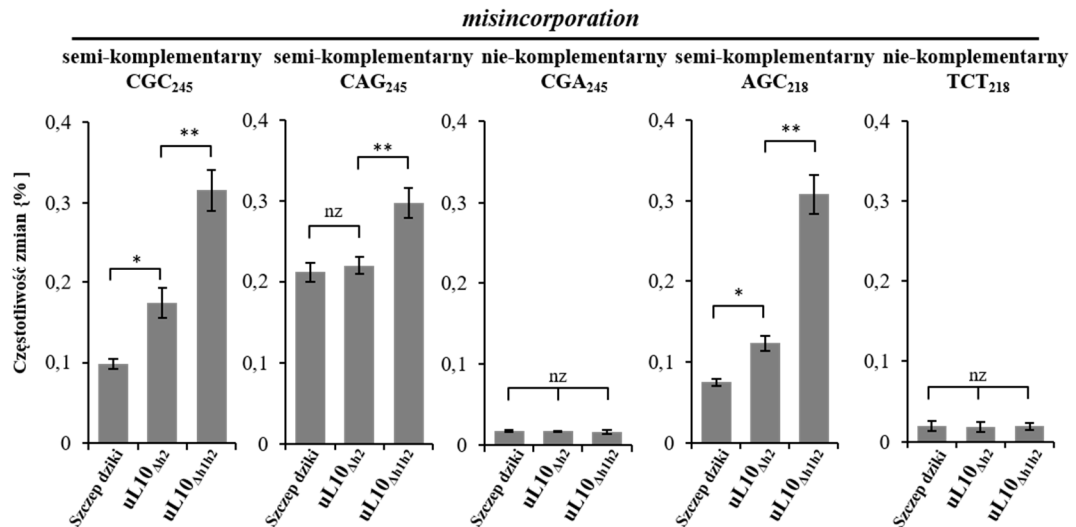


Fig. 39. Analiza „misincorporation” z zastosowaniem układu reporterowego dwóch lucyferaz wykorzystując zestaw mutantów drożdżowych. CGC₂₄₅, CAG₂₄₅ i AGC₂₁₈ opisują semi-komplementarne kodony w pozycjach 245 i 218 w obrębie enzymu reporterowego lucyferazy „firefly”; CGA₂₄₅ i TCT₂₁₈ reprezentują nie-komplementarne kodony znajdujące się w analogicznych pozycjach w lucyferazie „firefly”. Wszystkie dane są przedstawione jako procent aberracji translacyjnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Istotność statystyczną różnic oceniano metodą jednokierunkowej analizy zmiennych (ANOVA), a następnie testu *post hoc* Tukey’a (HSD), wskazano gwiazdkami: *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$; nz, nie znaczący.

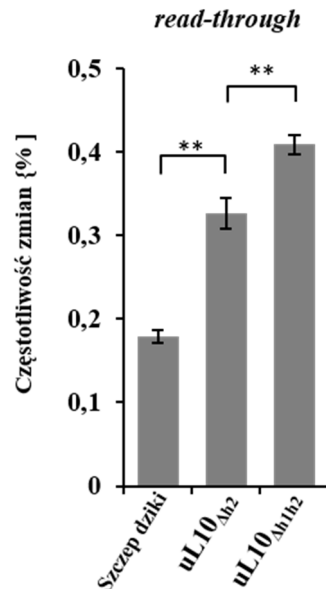


Fig. 40. Analiza „read-through” z zastosowaniem układu reporterowego dwóch lucyferaz. Wszystkie dane są przedstawione jako procent aberracji translacyjnej; słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe, a analizy statystyczne oceniano metodą jednokierunkowej analizy zmiennych (ANOVA), a następnie testu *post hoc* Tukey’a (HSD), wskazano gwiazdkami: *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$.

Ponadto, obserwowane synergistyczne działanie antybiotyku G418 w kontekście jednoczesnego braku białek P, to kumulacja działania dwóch czynników, które powodują wzrost błędów popełnianych przez rybosom, do poziomu letalnego dla komórki drożdżowej. W związku z tym, wykonane testy wyjaśniają nadwrażliwość komórek mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2} na aminoglikozydy, zaś mutant uL10_{Δh2} posiada skłonność do częstszych błędów, ale efekt działania synergistycznego w tym wypadku jest znaczenie mniejszy. Dodatkowo, wykonano analizy skierowane na inny aspekt działania rybosomu, w kontekście dokładności odczytu informacji genetycznej, a mianowicie testy +1 i -1 „*frameshifting*”. W tym względzie, zmiany ramki odczytu czy to w formie +1 czy -1, w przeciwieństwie do błędów typu „*misincorporation*”, które są niepożądane, odgrywają znaczącą rolę regulatorową ponieważ wiele genów ulega regulowanej ekspresji poprzez zmianę ramki odczytu przez rybosom. Przeprowadzone analizy wskazały 1,5-krotny wzrost częstotliwości zmian w przypadku zmiany ramki odczytu +1 (Fig. 41), podczas gdy nie zaobserwowano takich zmian dla przesunięcia ramki odczytu o 1 nukleotyd w kierunku 5' (-1 „*frameshifting*”). Wyniki te wskazują, że multiplikacja białek P ma nieoczekiwaną, nigdy nie przypisaną rolę, w utrzymywaniu precyzji dekodowania informacji, nie tylko zapewnienie precyzji dekodowania, ale także zmiany w obrębie stechiometrii kompleksu białek P mogą odgrywać ważną rolę regulatorową w utrzymaniu prawidłowej ramki odczytu a przede wszystkim przesunięcia ramki odczytu o 1 nukleotyd w kierunku 3'.

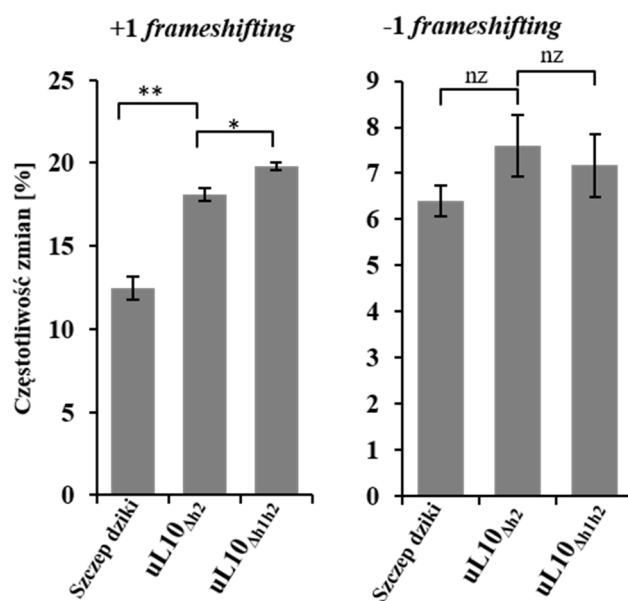


Fig. 41. Analiza zmian odczytu +1 i -1 „frameshifting”. Wszystkie dane przedstawiono jako procent aberracji translacyjnej. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe, a istotność statystyczną liczono jako dla pozostałych analiz; *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$; nz, nie znaczący.

V. DYSKUSJA

Proteom komórkowy jako jeden z kluczowych elementów metabolicznych komórki kształtowany jest (w szczególności w komórce eukariotycznej) na wielu poziomach, począwszy od regulacji ekspresji genów na poziomie transkrypcji a skończywszy na etapie translacji. Jest on kształtowany dynamicznie w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska zarówno zewnętrznego jak i wewnętrznego, co pozwala komórce eukariotycznej na reakcję i adaptację do zmiennych warunków środowiskowych. Transkrypcja jak i translacja odgrywają istotną rolę w kształtowaniu proteomu komórkowego, jednakże w ostatnich latach wskazuje się, że to translacja a przede wszystkim rybosom *per se* może odgrywać niebagatelną rolę w regulacji ilości i jakości proteomu w odpowiedzi komórki na warunki stresowe [150].

We wszystkich organizmach żywych rybosom stanowi rdzeń maszynierii translacyjnej i jest odpowiedzialny za dwie zasadnicze funkcje: dekodowanie informacji genetycznej i formowanie wiązania peptydowego [4]. Zarówno rybosomy prokariotyczne jak i eukariotyczne w znacznej części zbudowane są z rRNA (ok. 2/3 masy) oraz z białek (ok. 1/3 masy rybosomu) [4]. rRNA stanowi główny szkielet rybosomu a co najważniejsze jego tzw. katalityczną część i dlatego też rybosom uważany jest za rybozym. Białka rybosomalne, w znacznej części, stanowią element wspomagający działanie rybosomu, przede wszystkim jako element stabilizujący strukturę jednakże część z nich bierze również udział w modulacji procesu translacji [151]. Zatem, każdy komponent maszynierii translacyjnej, w tym rybosom, oraz takie elementy jak mRNA, aa-tRNA czy liczne białkowe czynniki translacyjne przyczyniają się do wydajnego przebiegu translacji [12]. Proces ten można rozpatrywać zarówno pod względem precyzji (jakościowym) jak i szybkości działania (ilościowym). Rybosom realizuje te dwa zadania za pośrednictwem trzech funkcyjnych miejsc: centrum dekodującego odpowiedzialnego za dekodowanie informacji genetycznej na mRNA; centrum peptydylo-transferazy, w którym następuje formowanie wiązań peptydowych na etapie elongacji łańcucha polipeptydowego oraz hydroliza peptydylo-tRNA na etapie terminacji, prowadząca do uwolnienia nowo zsyntetyzowanego peptydu; centrum GTPazowego, którego zadaniem jest uwolnienie energii zgromadzonej w GTP niezbędnej do prawidłowego przebiegu wszystkich etapów procesu translacji tj. inicjacji, elongacji, terminacji

i recyklingu [4] zapewniając tzw. jednokierunkową trajektorię/procesywność aparatu translacyjnego w biosyntezie białka [19].

Szereg badań na przestrzeni ostatnich lat skierowanych na poznanie procesu biosyntezy białka przy wykorzystaniu licznych metod z zakresu bioinformatyki, biochemii, biofizyki a przede wszystkim biologii strukturalnej wskazują, że przebieg translacji to skoordynowane działanie wielu elementów a w szczególności znaczenie ma nad wyraz rozbudowana regulacja allosteryczna w obrębie samego rybosomu. Badania te ukazują nowe spojrzenie na mechanizmy rządzące maszyną translacyjną wskazując, że współdziałanie wszystkich komponentów maszynierii translacyjnej nie tylko zapewnia wydajną syntezę białka ale reguluje przebieg dekodowania informacji genetycznej przez rybosom odgrywając kluczową rolę w procesie efektywnego fałdowania się nowo powstających białek [152, 153]. Zatem, ilość i forma funkcjonalna nowo syntetyzowanego białka może być kontrolowana na etapie procesu translacji. Wydajność translacyjna dla danego mRNA może zależeć nie tylko od jego sekwencji nukleotydowej, dostępności/ilości w komórce ale również od dostępnych innych zasobów maszynierii translacyjnej, w tym puli wolnych rybosomów, aa-tRNA i czynników translacyjnych. W tym kontekście dużego znaczenia nabiera tzw. hipoteza wyspecjalizowanych rybosomów postulująca występowanie lub pojawianie się w komórce grupy zmodyfikowanych rybosomów (w obrębie rRNA, białek rybosomalnych lub innych elementów maszynierii translacyjnej), które mogą kształtować proteom pod względem ilościowym czy jakościowym [151].

Obecnie, doskonale poznanym mechanizmem regulacji ekspresji informacji genetycznej na poziomie translacji jest etap inicjacji, a przede wszystkim dwa doskonale poznane zjawiska: fosforylacja eIF2 α czy defosforylacja 4E-BP [154, 155, 156, 155]. Na przykład, podczas fazy inicjacji translacji, rybosom jest rekrutowany na mRNA zgodnie z dostępnością potrójnego kompleksu met-tRNAi-eIF2 α -GTP, zaś poziom fosforylacji tego czynnika jest regulującym elementem rekrutacji met-tRNAi do rybosomu, co determinuje wydajność inicjacji i formowanie aktywnie kompetentnego rybosomu. Co ważne, fosforylacja eIF2 α nie tylko zmienia wydajność etapu inicjacji, co ma bezpośrednie przełożenie na ilościowy aspekt translacji, ale zmienia także translację pod względem jakościowym, dostosowując proteom do warunków stresowych. Doskonałym przykładem tego jest ekspresja białka GCN4 u drożdży czy ATF4 u wyższych eukariontów [154, 157]. Ponadto

dynamika inicjacji może mieć wpływ na ilość „rekrutowanych” rybosomów na mRNA i formowanie polisomów. Duża ilość rybosomów na mRNA w formie polisomów wpływa pozytywnie na szybkość biosyntezy polipeptydu. Wykazano, że pierwsza inicjacja na nici mRNA jest wolniejsza niż kolejne [158], co może być spowodowane strukturą mRNA. Ponadto dynamika biosyntezy białka jest znacznie wyższa w układzie polisomów [153, 159]. Uważa się, że wydajność translacyjna jest także modulowana na etapie elongacji. Wydajność procesu translacji zależy od rodzaju kodonów na mRNA w stosunku do dostępnych aa-tRNA oraz struktur drugorzędowych mRNA, co może być sygnałem hamującym translacyjną aktywność rybosomu. To z kolei, może modulować szybkość biosyntezy łańcucha polipeptydowego i jego fałdowanie [18, 152]. Ponadto szereg wspomagających czynników translacyjnych jak eEF1A, eEF1B czy eEF2 ulegają post-translacyjnym modyfikacjom jak fosforylacja, co w większości przypadków prowadzi od zahamowania translacji lub znacznego jej spowolnienia [154, 160]. Rozpatrując etap elongacji w cyklu translacyjnym obejmuje on trzy kroki: dekodowanie informacji na mRNA, formowanie wiązania peptydowego i translokację rybosomu na mRNA o jeden kodon. Podczas etapu dekodowania, aa-tRNA w formie kompleksu z EF-Tu/eEF1A (bakterie/eukariota) z GTP (ang. „*ternary complex*” - TC) wiąże się z rybosomem zgodnie z regułą oddziaływania kodon-antykonon na mRNA w miejscu A [73, 153]. Dekodowanie obejmuje dwa etapy, tzw. etap selekcji kompleksu TC (ang. „*initial selection*”) oraz wiązanie aa-tRNA po hydrolizie GTP i uwolnienie czynnika translacyjnego (ang. „*proofreading*”). Podczas etapu selekcji TC, wiele różnych kompleksów konkuruje o wiązanie z rybosomem, co umożliwia wybranie aa-tRNA, który jest komplementarny z kodonem mRNA [152]. Należy podkreślić, że w puli aa-tRNA, obecność komplementarnego aa-tRNA z danym kodonem na rybosomie w miejscu A, stanowi jedynie niewielką część całkowitej dostępnej puli aa-tRNA. W puli tej występują także tzw. semi-komplementarne aa-tRNA (posiadające potencjał do interakcji z kodonem mRNA w miejscu A, ale praktycznie nie ulegające selekcji) i nie-komplementarne kompleksy (brak komplementarności). Te dwie pule aa-tRNA w formie TC, konkurują z komplementarnymi kompleksami o wiązanie z rybosomem [161]. Należy podkreślić, że szybkość i specyfika selekcji w pierwszej fazie etapu dekodowania tj. ang. „*initial selection*” jest podobna dla wszystkich kompleksów czyli dla komplementarnych, semi-komplementarnych, nie-komplementarnych

kompleksów TC. Posiadają one takie samo powinowactwo pod względem kinetyki wiązania TC [162]. Proces wiązania TC (ang. „*initial binding*”) kinetycznie przebiega identycznie dla wszystkich rodzajów TC a zasadnicza dyskryminacja zachodzi na późniejszym etapie, rozpoznawania kodonu przez antykodon (ang. „*codon recognition*”) [161]. Rozpoznanie kompleksu kodon-antykodon jest realizowane przez rybosom, na zasadzie tzw. strukturalnej weryfikacji, która jest zasadniczym elementem dekodowania informacji genetycznej przez rybosom. Strukturalną weryfikację przechodzi tylko właściwy kompleks kodon-antykodon, zaś semi- i nie-komplementarne układy nie są weryfikowane i kompleks TC ulega oddysocjowaniu [163]. Po pozytywnej strukturalnej weryfikacji, ang. „*codon recognition*” następuje aktywacja hydrolizy GTP przez rybosom, czego dokonuje EF-Tu czy jego eukariotyczny homolog eEF1A. Proces hydrolizy GTP kończy etap ang. „*initial selection*” i zapoczątkowuje ang. „*proofreading*”. W procesie tym następuje zmiana strukturalna w kompleksie TC, powodująca uwolnienie czynnika translacyjnego EF-Tu/eEF1A z rybosomu. Podczas gdy czynnik oddysocjuje od rybosomu, koniec CCA aa-tRNA jest uwolniony i przesuwa się do miejsca A w centrum peptydylotransferazy na dużej podjednostce rybosomu, co czyni go gotowym do reakcji z peptydylo-tRNA w miejscu P. Na tym etapie, zachodzą znaczące zmiany strukturalne w obrębie tRNA a przede wszystkim w obrębie tzw. pętli antykodonowej. Jeśli na etapie „*initial selection*” został jednak omyłkowo wprowadzony niewłaściwy aa-tRNA to ulega on uwolnieniu z racji na niestabilne wiązanie kodon-antykodon, które jest wynikiem braku strukturalnej weryfikacji i stabilizacji przez rybosom [164]. Po kroku jakim jest dekodowanie, następuje reakcja utworzenia wiązania peptydowego między nowoprzybyłym aminokwasem a peptydylo-tRNA w PTC, co w rezultacie skutkuje pojawianiem się peptydylo-tRNA w miejscu A i deacylowane tRNA zajmuje miejsce P. Ostatni etap w cyklu elongacyjnym to etap translokacji. Powstałe deacylowane tRNA i nowe peptydylo-tRNA wydłużone o jeden aminokwas, odpowiednio, przemieszczają się z A do P i P do E, a proces ten jest „katalizowany” przez czynnik elongacyjny, EF-G u bakterii czy homologiczny eukariotyczny eEF2. Czynnik ten należy do translacyjnych GTPaz a energia pozyskana z hydrolizy GTP napędza translokację. Po tym etapie rybosom jest gotów na następną rundę elongacji [164].

Należy podkreślić, że proces elongacji z dwoma zasadniczymi etapami, dekodowaniem i translokacją, może przebiegać „spontanicznie” bez udziału

wspomagających białkowych czynników translacyjnych typu GTPaz - trGTPaz. Jednakże, jego przebieg jest bardzo wolny, co w konsekwencji nie zapewniałoby komórce odpowiedniej ilości białek. Zatem, dla efektywnego przebiegu wszystkich etapów translacji a przede wszystkim elongacji, potrzebna jest energia, która pozyskiwana jest przez rybosom z hydrolizy GTP za pośrednictwem trGTPaz. Czynniki te wspomagają rybosom, nie tylko przyspieszając poszczególne etapy translacji ale co ważniejsze nadają temu procesowi jednokierunkową trajektorię oraz warunkują unikalny czas dla poszczególnych etapów/kroków w cyklu translacyjnym [4, 19]. Ponadto, trGTPazy jako kluczowy element, napędzający proces biosyntezy białka, stanowią doskonały element regulatorowy, który może modulować jakość czy ilość syntetyzowanych białek (aspekt translacji bardzo mało poznany). Miejsce interakcji trGTPaz z rybosomem znajduje się na dużej podjednostce rybosomalnej, zwanym centrum GTPazowym (ang. „*GTPase Associated Center*” - GAC). Reprezentuje ono konserwatywny element rybosomalny, w którym zachodzi stymulacja aktywności katalitycznej trGTPazy [20]. W skład centrum GAC wchodzi dwa główne elementy: konserwatywny fragment rRNA zwany pętlą sarcynowo-rycynową (ang. „*sarcin-ricin loop*” - SRL) oraz kompleks białek rybosomalnych formujący charakterystyczną boczną strukturę zwaną popularnie „kciukiem” rybosomalnym [21]. Obecnie, konserwatywny element SRL jest uważany za główny stymulator hydrolizy GTP za pośrednictwem trGTPaz. SRL nie wykazuje potencjału regulatorowego, co czyni ten element jedynie „uczestnikiem” wydarzenia jakim jest translacja [164]. Białkowa część GAC, to rozbudowany element rybosomu o unikalnej budowie, zbudowany w przeważającej części z białek rybosomalnych, w przeciwieństwie do innych elementów rybosomalnych, których funkcjonowanie determinowane jest przez rRNA. Zasadniczym elementem struktury GAC jest „kciuk” rybosomalny, który zawiera dwie funkcjonalnie odrębne ewolucyjnie części: tzw. podstawę i wyniosłość boczną. Podstawę „kciuka” stanowią białka rybosomalne uL11 i uL10 wiążące się z RNA, zaś wyniosłość boczna zbudowana jest z dimerów białek P1-P2 u eukariontów/archeonów lub (bL12)₂ u prokariotów [21, 47]. Unikatową cechą „kciuka” rybosomalnego jest multiplikacja białek formujących wyniosłość boczną [85, 165]. U prokariotów występuje szereg układów: pentamer uL10-(bL12)₄ u bakterii mezofilnych, heptamer uL10-(bL12)₃ u bakterii termofilnych natomiast u cyjanobakterii oktamer uL10-(bL12)₇ [36]. Archeony posiadają heptamer uL10-(P1-P1)₃ będący homologiem układu eukariotycznego.

U eukariontów występuje tylko jeden układ pentameryczny, uL10-(P1-P2)₂, ale na uwagę zasługuje fakt, że eukariotyczne białko uL10 posiada dodatkową domenę, zwaną domeną P, wykazującą wysoką homologię z białkami P1/P2. W konsekwencji, eukariotyczny „kciuk” zawiera pięć elementów o bardzo wysokiej homologii, cztery to białka P1/P2 oraz domena P białka uL10. Chociaż wszystkie pięć elementów warunkuje pełną aktywność translacyjną rybosomów [11], obecność tylko jednego jest wystarczająca do utrzymania żywotności komórek i zapewnienia aktywności translacyjnej rybosomu [80, 82]. Należy jednak podkreślić, że rola multiplikacji białek „kciuka” rybosomalnego a przede wszystkim wkład indywidualnych C-końcowych fragmentów będących elementem funkcjonalnym tych białek nie została nigdy wyjaśniona.

Wykorzystując liczne analizy biochemiczne na modelu bakteryjnym wykazano, że „kciuk” wiąże trGTPazy i wraz z SRL, jest niezbędnym elementem stymulującym hydrolizę GTP za pośrednictwem trGTPaz [20, 79, 166]. Wyniki biochemiczne zostały poparte analizami strukturalnymi, które pokazały specyficzne interakcje między „kciukiem” a trGTPazami [73, 74, 75, 167]. Analogiczne eksperymenty z użyciem modelu eukariotycznego czy archeae potwierdziły, że białka P1/P2 są zaangażowane w wiązanie i stymulację trGTPaz [85, 168], jednakże należy podkreślić, że są one homologami funkcjonalnymi białek bakteryjnych bL12 a analogami strukturalnymi, które pojawiły się w wyniku ewolucji konwergentnej [165].

Otrzymane wyniki wskazały, że ogólna wydajność translacyjna mierzona w warunkach *in vivo* jest znacznie zmniejszona w przypadku braku wszystkich białek P1/P2 na rybosomach, co potwierdzają wcześniejsze dane otrzymane na bazie analiz z wykorzystaniem modelowego drożdżowego układu translacji *in vitro* [50]). Te ilościowe zaburzenie translacyjne znalazły odzwierciedlenie w obserwowanym fenotypie mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2}, który objawiał się powolnym wzrostem. Obniżenie dynamiki translacji obserwowane w mutancie uL10_{Δh1h2} można przypisać mniejszej liczbie translacyjnych rybosomów, ale zmiany ilościowe nie wyjaśniają w pełni obserwowanego fenotypu. Poprzednie analizy innych grup badawczych wykazały, że szczep drożdżowy pozbawiony wszystkich genów dla białek P1/P2 (mutant delecyjny) oprócz fenotypu związanego z powolnym wzrostem wykazywał także wrażliwość na niską temperaturę i niezdolność do sporulacji [92]. W niniejszej pracy wykazano także, że obserwowany fenotyp w formie powolnego wzrostu jest

głównie związany z zaburzeniem cyklu komórkowego, w którym przede wszystkim zaobserwowano przedłużenie fazy G1, co może powodować wydłużenie tzw. czasu generacji komórki drożdżowej. Sugeruje to, że zaburzenia w ilości białek P na rybosomie, nie tylko mogą zmieniać wydajność translacji ale również profil metaboliczny komórek drożdży. Wniosek ten znajduje swoje poparcie z obserwacją pokazującą, że zmiany w architekturze „kciuka” powodują fluktuacje w drożdżowym proteomie, wskazując na regulacyjną rolę białek P w kształtowaniu profilu białek w komórce [92]. Dobitnym tego przykładem jest obserwacja wskazująca, że mutant uL10 Δ h1h2 nie jest w stanie wykorzystywać tzw. niefermentowalnych źródeł węgla, tj. glicerolu czy etanolu. Zatem, zaburzenia w obrębie „kciuka” rybosomalnego niosą perturbacje w ekspresji białek związanych z metabolizmem tlenowym, a tym samym znaczenie mają jakościowe a nie ilościowe zaburzenia w obrębie maszyny translacyjnej. Teza ta, znajduje swoje potwierdzenie w analizach profili polisomów włączając w to „runoff”. Badania te wskazują, że brak białek P1/P2 na rybosomie nie zaburza skutecznie żadnego z poszczególnych etapów translacji. Co więcej, analiza „half transit time” mierząca dynamikę procesu elongacji, zasadniczy element w cyklu translacyjnym, wskazuje jednoznacznie, że rybosom pozbawiony białek P1/P2 prowadzi proces translacji z dynamiką podobną do niezmiennego układu. Obserwacja ta może wskazywać na pozorną niespójność, między stanem wiedzy pokazującym, że białka te odrywają kluczową rolę w stymulacji hydrolizy GTP, więc tym samym w szybkości translacji a obserwacją na bazie „half transit time”. Nawet jeśli hydroliza GTP i aktywność polimeryzacyjna na rybosomach pozbawionych białek P1/P2 jest wolniejsza, jak wykazano w analizach *in vitro* [50, 82], to aktywność rybosomów tylko z białkiem uL10 (zawierającym domenę P, która stanowi najmniejszy funkcjonalny element „kciuka” rybosomalnego) wydaje się być wystarczająca do utrzymania odpowiedniej wydajności maszyny translacyjnej *in vivo* i wzrostu komórek drożdży.

Najbardziej zaskakującym wynikiem analiz, jaki wykazano w niniejszej pracy są zaobserwowane zaburzenia w zakresie dekodowania informacji genetycznej obserwowane jako wzrost częstotliwości mylenia się rybosomu pozbawionego białek P1/P2. Zatem, powielenie białek P powiązane jest z jakościowym a nie ilościowym aspektem funkcjonowania rybosomu. Analizy oparte na systemie wykorzystującym dwie lucyferazy jako układ reporterowy („Dual Luciferase Assay Reporter System”), przedstawione w niniejszej pracy wykazały, że zakłócenie architektury „kciuka”

wpływa w szczególności na proces dekodowania, co objawia się wprowadzeniem błędnego aminokwasu („*misincorporation*”) oraz supresją kodonu stop („*read-through*”). Zaburzenie w architekturze „kciuka” niesie także perturbacje we właściwym odczycie informacji na RNA przez rybosom określane jako przesunięcie ramki odczytu o 1 nukleotyd w kierunku 3’, tj. +1 PRF, („*frameshifting*”). Wyniki te stoją w opozycji do badań innych grup badawczych, w których nie powiązano białek P z dokładnością dekodowania informacji genetycznej w procesie translacji [92]. Rozbieżności między wynikami badań przedstawionymi w niniejszej pracy a danymi opublikowanymi wcześniej [92] wynikają z zastosowania różnych metod eksperymentalnych a co ważniejsze innego układu eksperymentalnego, tj. mutantów delecyjnych pozbawionych tylko jednej pary białek P1/P2. Remacha i in. zastosowali system translacji *in vitro* oraz test oparty na pojedynczym genie reporterowym dla enzymu β -galaktozydazy. Analiza ta jest znacznie mniej czuła niż „*Dual Luciferase Assay Reporter System*”. Jednakże co najważniejsze w analizie tej autorzy użyli tzw. delecyjnego szczepu drożdżowego zawierającego delecję tylko dwóch genów (P1B i P2A). Skutkowało to tym, że w szczepie drożdżowym rybosomy posiadały trimeryczną architekturę „kciuka”. Rybosomy w takiej konfiguracji, jak wykazano w niniejszej pracy, są mniej podatne na błąd dekodowania (szczep drożdżowy uL10 Δ h2). Zatem, analizy przedstawione w pracy nie tylko wskazują, że zaburzenia architektury w obrębie pentamerycznego kompleksu białek P prowadzą do zaburzeń dekodowania informacji genetycznej ale co ciekawe pokazują korelację między liczbą kopii białek P na rybosomie i wpływem na dokładność tłumaczenia mRNA. Zatem, zubożenie rybosomu w formie braku jednego dimeru, objawia się umiarkowanym defektem dekodowania, podczas gdy już brak dwóch dimerów powoduje znaczny wzrost częstotliwość mylenia się rybosomu. Analizy wykorzystujące system dwóch lucyferaz jako układ reporterowy znalazły swoje poparcie w innych obserwacjach. Mianowicie mutanty drożdżowe a przede wszystkim uL10 Δ h1h2, wykazują nadwrażliwość na szereg antybiotyków z grupy aminoglikozydów, na przykład G418. Antybiotyki te bezpośrednio oddziałują z miejscem dekodującym rybosomu i wpływają negatywnie na dekodowanie informacji genetycznej. Zaobserwowany synergistyczny efekt stanowi potwierdzenie analiz z użyciem „*Dual Luciferase Assay Reporter System*” oraz potwierdza odwrotną korelację między ilością białek P i precyzją dekodowania. Dalsze potwierdzenie przeprowadzonych badań przyniosła analiza z wykorzystaniem

antybiotyku G418 wykorzystując jedynie tzw. dziki szczep drożdżowy. Szczep ten traktowany antybiotykiem G418 wykazywał zmniejszoną precyzję dekodowania, jak pokazano na kontrolnych testach „*Dual Luciferase Assay Reporter System*”. Istotne jest jednak, że prowadziło to do spowolnienia wydajności translacji a spadek ten był skorelowany ze spadkiem ilości frakcji polisomów, tak jak to miało miejsce u mutantu uL10_{Δh1h2}. Ponadto nie zaobserwowano perturbacji w działaniu maszynerii translacyjnej wykorzystując analizy profili polisomów czy „*half tranist time*”, co potwierdza obserwacje z wykorzystaniem mutantów drożdżowych. Najbardziej uderzającym dowodem łączącym proces dekodowania z regulacją ekspresji informacji genetycznej jest zaobserwowany fenotyp odnotowany dla komórek szczepu dzikiego pokazujący, że szczep ten w obecności antybiotyku G418 nie wykorzystuje niefermentowalnych źródeł węgla (identycznie jak zaobserwowano dla mutantu drożdżowego uL10_{Δh1h2}). Wyniki te sugerują, że zaburzenia w strukturze „kciuka” rybosomalnego, które objawiają się jako defekt dekodowania informacji genetycznej mogą mieć wpływ na translację specyficznych mRNA. Co ciekawe, analiza z wykorzystaniem konstruktów genetycznych w celu komplementacji mutantów drożdżowych pokazała, że już obecność niewielkiej puli rybosomów zubożonych o białka P1/P2 wywiera dominujący, negatywny wpływ na komórki typu dzikiego. Sugeruje to tym samym, że nawet niewielka część zmienionych rybosomów może wywierać znaczący efekt metaboliczny. Obserwacje te mogą po części tłumaczyć zjawisko, które zostało zaobserwowane już w latach 70-tych XX wieku, pokazujące tzw. wymienialność białek P między pulą cytoplazmatyczną a białkami na rybosomie [94]. Wymienialność białek P1/P2 może mieć charakter regulatorowy, a fluktuacje w obrębie stechiometrii „kciuka” rybosomalnego mogą być odzwierciedleniem dostosowania się maszynerii translacyjnej do wymogów metabolicznych komórki. Zatem, zmienna kompozycja kompleksu białek P może być elementem kształtującym niejednorodności maszynerii translacyjnej i pojawiania się wyspecjalizowanych rybosomów.

W świetle otrzymanych wyników nasuwa się pytanie, jak można wytłumaczyć zaobserwowane zjawisko w kontekście funkcjonowania maszynerii translacyjnej. Ponieważ architektura GAC, w tym też „kciuka” rybosomalnego, jest konserwatywna w związku z tym mechanizm rekrutacji trGTPazy do rybosomu jak i stymulacji hydrolizy GTP uważa się za uniwersalny i można posłużyć się modelem translacji opracowanym dla prokariotów. Zatem, zaburzenia wiązania

trGTPaz do rybosomu powinny wpływać na ich funkcję w podobny sposób u prokariotów i eukariotów. Eksperymenty kinetyczne wykazały, że asocjacja trGTPaz z rybosomami odbywa się znacznie szybciej niż zostało to obliczone dla losowego mechanizmu wiązania trGTPaz [153, 169]. W związku z tym zaproponowano, że „kciuk” rybosomalny może odgrywać ważną rolę w zwiększaniu powinowactwa trGTPazy do rybosomu, poza jego podstawową funkcją jaką jest stymulacja hydrolizy GTP przez trGTPazy [20, 170]. W takiej sytuacji, rozpatrując krok translokacji w cyklu elongacyjnym, który jest katalizowany przez czynnik elongacyjny EF-G/eEF2, to zaburzenia w architekturze „kciuka” powinny wpływać w takim samym stopniu na dekodowanie (zależne od EF-Tu/eEF1A) jak i translokację, ponieważ etap elongacji w cyklu translacyjnym wykorzystuje równą liczbę cykli zależnych od EF-G/eEF2 i EF-Tu/eEF1A. Co ciekawe, taka sytuacja została opisana dla komórek drożdżowych zubożonych o białko rybosomalne uL11, które należy do elementu GAC i stanowi podstawę „kciuka” rybosomalnego [68]. Białko uL11 obecne jest na rybosomie w pojedynczej kopii. Komórki drożdżowe, w których na drodze delekcji usunięto gen dla białka uL11 posiadały rybosomy pozbawione tego białka. Objawem tego defektu były zaburzenia na wszystkich etapach biosyntezy białka zależnych od trGTPaz, w tym: w biogenezie rybosomów, łączeniu się podjednostek, elongacji i terminacji procesu translacji. Zjawisko to zaobserwowano zwłaszcza na etapie elongacji procesu translacji, który objawiał się przede wszystkim jako zaburzenie w stopniu podatności rybosomu na błędny odczyt ramki odczytu w formie przesunięcia o 1 nukleotyd w kierunku 3' (+1 PRF, „*frameshifting*”) lub o jeden nukleotyd w kierunku 5' (-1 PRF, „*frameshifting*”) [68]. Sytuacja jest bardziej złożona w przypadku białek P1/P2, które istnieją na rybosomie drożdżowym w czterech kopiach. Razem z domeną P pochodząca z białka uL10, „kciuk” zawiera w sumie pięć funkcjonalnych C-terminalnych fragmentów. Ostatnie opracowane modele strukturalne różnych trGTPaz w kompleksie z rybosomem bakteryjnym (czy kompleksy białek P z trGTPazami ujawniły, że tylko jeden C-terminalny fragment polipeptydu, czy to białek bL12 czy białek P oddziałuje z domeną G trGTPaz [73, 85, 168, 171]. Można zatem założyć, że tylko jeden region C-końca białek „kciuka” jest niezbędny i zarazem wystarczający do stymulacji każdej trGTPazy. Potwierdziły to analizy *in vitro* i *in vivo*, że obecność białka uL10 z domeną P jest wystarczająca do funkcjonowania maszynerii translacyjnej [92, 50]. W niniejszej pracy wykazano,

że brak wszystkich białek P1/P2 (pozostawiając tylko jeden funkcjonalny C-koniec na rybosomie usytuowany na białku uL10) nie ma wpływu na większość funkcjonalnych aspektów działania rybosomu, włączając w to: biogenezę, inicjację i łączenie się podjednostek oraz translokację. Jednak dokładność dekodowania, jednej z głównych aktywności rybosomalnych okazała się ściśle zależna od liczby kopii białek P1/P2. Biorąc pod uwagę wcześniejsze obserwacje pokazujące, że wzrost liczby kopii białek P1/P2 obecnych na rybosomie stymuluje wydajną hydrolizę GTP *in vitro* [50], można przyjąć, że skuteczność hydrolizy GTP przez trGTPazy *in vivo* zależy również od liczby C-końcowych elementów białek P. Na potwierdzenie tej tezy, można przytoczyć obserwację dokonaną na bazie analiz kinetyki oddziaływań białek P z białkiem rycyną, które wykorzystuje interakcje z „kciukiem” rybosomalnym do procesu depurynacji pętli sarcynowo-rycynowej. Analizy wykazały, że ilość białek P miała decydujący wpływ na kinetykę oddziaływań rycyny z „kciukiem” a obniżenie ilości białek P znacząco obniżało powinowactwo rycyny do rybosomu [172]. Zatem, zmniejszenie liczby białek P1/P2 prawdopodobnie zmniejszy wydajność hydrolizy GTP *in vivo* dla wszystkich trGTPaz w podobnym stopniu. Jednak fizjologiczne konsekwencje takiego zmniejszenia wydajności hydrolizy GTP wydają się być nierozróżnialne w warunkach *in vivo* przede wszystkim w ujęciu ilościowym działania maszyneryi translacyjnej. Zatem, jeśli tryb oddziaływań białek P jest taki sam dla wszystkich trGTPaz, nasuwa się pytanie co powoduje tę różnicę fizjologiczną, objawiająca się w formie zaburzenia w dekodowaniu? Odpowiedzią jest: CZAS. Jak wykazano, wykorzystując model bakteryjny i badając kinetykę hydrolizy GTP, szybkości hydrolizy GTP różni się istotnie między poszczególnymi trGTPazami. I tak, jak wykazano dynamika hydrolizy GTP dla poszczególnych trGTPaz wynosi: $0,1\text{ s}^{-1}$ dla RF3 (czynnik terminacyjny) [173], 36 s^{-1} dla IF2 (czynnik inicjacyjny) [174], 250 s^{-1} dla EF-G (czynnik prowadzący translokację) [175] i ponad $>500\text{ s}^{-1}$ dla EF-Tu (czynnik biorący udział w dekodowaniu) [176]. Należy podkreślić, że w przeprowadzonych analizach nie zauważono żadnego defektu na etapie inicjacji, translokacji i terminacji *in vivo*. Zatem można pokusić się o wniosek, że zmniejszenie dynamiki hydrolizy GTP spowodowane zmniejszeniem liczby C-końcowych elementów białek P1/P2 nie wpływa na ogólną wydajność funkcjonowania rybosomu podczas realizacji wspomnianych już poszczególnych etapów w procesie translacji. Analizy kinetyczne wskazały, że proces dekodowania,

w którym bierze udział EF-Tu/eEF1A jest bardzo wymagający pod względem energetycznym i bardzo szybki, jak pokazały analizy kinetyczne. Wskazano, że na tym etapie podstawowym elementem różnicującym między włączeniem kodonu komplementarnego a semi-komplementarnego jest rozpoznanie i strukturalna weryfikacja tzw. dupleksu kodon-antykodeon, a szybkość aktywacji hydrolizy GTP gra kluczową rolę. Aktywacja (EF-Tu/eEF1A w kompleksie z aa-tRNA/GTP) hydrolizy GTP powoduje, że rybosom przechodzi w stan, który hierarchizuje między komplementarnym a semi-komplementarnym aa-tRNA, co w konsekwencji prowadzi do oddysocjowania kompleksu z semi-komplementarnym aa-tRNA [176]. Zatem, przejście od stanu nieaktywnej do aktywnej trGTPazy (TC) jest bardzo szybkie, wskazując, że kompleks TC jest dostosowany do szybkiej odpowiedzi na „informację” płynące z centrum dekodującego po rozpoznaniu dupleksu kodon-antykodeon. Zatem, można zaproponować, że wydajna interakcja białek P1/P2 z kompleksem TC może stanowić istotny element zapewniający krótki a zarazem właściwy czas aktywacji trGTPazy, a tym samym multiplikacja P1/P2 może zapewniać wsparcie w początkowej selekcji właściwego aa-tRNA przez rybosom. Na poparcie tej tezy można przytoczyć dane przedstawiające kinetyczny model dekodowania, który zakłada, że przedłużona obecność (pauzowanie) kompleksu TC z semi-komplementarnym aa-tRNA w rybosomalnym miejscu A, może prowadzić do włączenia tego aa-tRNA [177]. Spowodowane jest to tym, że prawdopodobieństwo hydrolizy GTP wzrasta wraz z czasem, w którym kompleks TC spędza na rybosomie. Zatem aktywacja hydrolizy GTP indukowana przez właściwą interakcję kodon-antykodeon w centrum dekodowania musi być bardzo szybka, a jak wykazano wyjątkowo wysoka wydajność EF-Tu/eEF1A do hydrolizy GTP ($>500 \text{ s}^{-1}$) może zapewnić tylko wiele kopii białek P1/P2.

Dodatkowym dowodem na poparcie proponowanej tezy dotyczącej roli powielenia białek P1/P2 jest obserwowany wzrost +1 PRF, podczas gdy -1 PRF pozostaje niezmienny. Proponowany model PRF wskazuje, że +1 PRF ma miejsce, gdy rybosomalne miejsce A jest puste, a miejsce P jest zajęte, czyli rybosom jest kompetentny aby przyjąć kompleks TC (etap dekodowania), podczas gdy -1 PRF jest promowane, gdy na rybosomie obydwa miejscami A i P są zajęte (etap translokacji) [178]. Zatem, wzrost +1 PRF wskazuje, że brak białek P1/P2 wywiera negatywny wpływ na proces dekodowania przez rybosom. Najprawdopodobniej brak białek P1/P2 opóźnia czas interakcji TC i hydrolizy GTP co w konsekwencji zwiększa

prawdopodobieństwo +1 PRF. W konsekwencji, zaprezentowane dane wskazują, że zaburzenia w strukturze „kciuka” rybosomalnego a mianowicie redukcja białek P1/P2, zmniejszają precyzję translacji. Zatem, można postulować, że główną rolą multiplikacji białek P1/P2 jest zaangażowanie w proces dekodowania poprzez efektywną stymulację czynnika EF1A, a to z kolei przekłada się na wydajną selekcję właściwego aa-tRNA i kontrolę dokładności translacyjnej.

Badania realizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej przyniosły także interesujące wyniki związane z działaniem antybiotyku sordarin, który jest postrzegany jako obiecująca substancja w leczeniu infekcji grzybiczych [179]. Uważa się, że antybiotyk ten hamuje proces translacji na etapie elongacji, a przede wszystkim wskazano, że ulega on interakcji z trGTPazą - eEF2 [63], jednak mechanizm działania sordarinu nie został dokładnie poznany. Zaproponowano, że miejsce wiązania sordarinu jest zlokalizowane między eEF2, a podstawą „kciuka” rybosomalnego, białkiem uL10. Zaburzenia w architekturze centrum GAC, czy to mutacje w uL10 czy brak białka uL40, które jest jednym z elementów GAC [180], prowadzą do uzyskania oporności czy wrażliwości komórek drożdżowych na ten antybiotyk. Zatem, sordarin może być traktowany jako sonda molekularna do analizy zaburzeń w obrębie centrum GAC. W trakcie analiz wykazano, że mutanty drożdżowe pozbawione białek P1/P2 wykazują oporność na sordarin. Zaskakujące wyniki przyniosła analiza profili polisomów wskazując, że nie następuje blokada translacji na etapie elongacji, jak można by się spodziewać na bazie informacji literaturowych lecz prawdopodobnie zahamowanie maszyneryi translacyjnej zachodzi na etapie terminacji/recyklingu. Wynik ten sugeruje, że sordarin może efektywnie blokować działanie trGTPazy RF3 odpowiedzialnej za terminację lub działanie kompleksu Dom43/Hbs1, trGTazy nie biorącej udziału w translacji *per se*, ale odpowiedzialnej za rekrutację wolnych rybosomów 80S poprzez ich dysocjację do wolnych 40S i 60S, które mogą zasilić maszynę translacyjną [181]. Zatem, wyniki te mogą wskazywać na odmienny mechanizm blokady translacji przez sordarin, niż dotychczas sądzono, implikując terminację/recykling jako cel tego antybiotyku.

PODSUMOWANIE

Przedstawione prace badawcze pozwoliły na opisanie nowej roli rybosomalnych białek P a w szczególności, funkcji multiplikacji tych białek na rybosomie eukariotycznym. Wykazano, że multiplikacja białek P a przede wszystkim obecność pięciu charakterystycznych C-terminalnych fragmentów, pochodzących z białek P1/P2 i z białka uL10, odgrywa istotną rolę wspomagającą proces dekodowania informacji genetycznej przez rybosom. Na bazie otrzymanych wyników można zaproponować model działania rybosomu z zaburzeniem w obrębie „kciuka” rybosomalnego, w formie braku białek P1/P2 (Fig. 42).

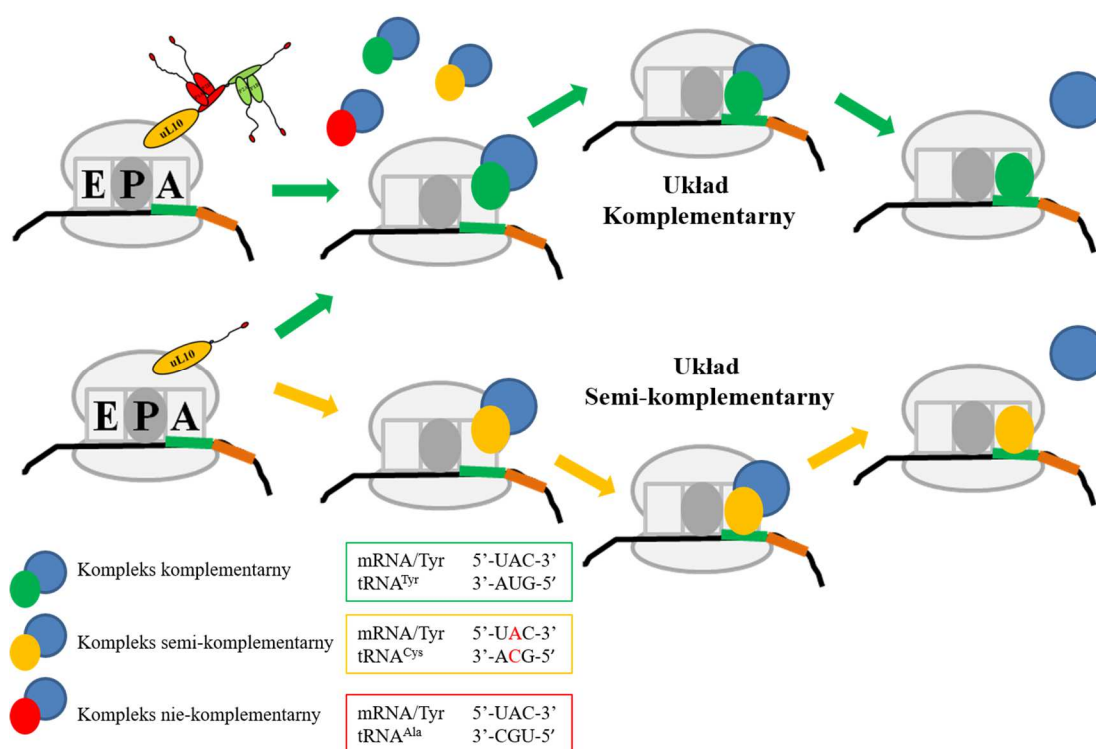


Fig. 42. Model funkcjonowania rybosomu z defektem w obrębie kompleksu białek P. Kontrola - rybosom zawierający pełny zestaw białek P1/P2; uL10Δh1h2 - rybosom pozbawiony białek P1/P2; kompleksy aa-tRNA/EF1A oznaczono schematycznie, kolor niebieski - EF1A zaś trzema kolorami oznaczono poszczególne typy aa-tRNA: zielony - układ komplementarny kodujący Tyr, żółty - semi-komplementarny, czerwony - nie-komplementarny; w ramkach podano przykładowe układy, które są komplementarne, semi-komplementarne i nie-komplementarne.

W procesie translacji, obecność wszystkich białek P na rybosomie warunkuje wysoką precyzję dekodowania informacji genetycznej, czego rezultatem jest wprowadzenie odpowiedniego aminokwasu na bazie właściwego kodonu na mRNA (Fig. 42, górny panel). Zmiany w obrębie stechiometrii kompleksu białek P, zaburzają precyzję działania rybosomu, objawiającą się wbudowaniem błędnego aminokwasu do nowotworzonego polipeptydu (Fig. 42, dolny panel), co niesie w sobie potencjał regulatorowy w funkcjonowaniu rybosomu jako elementu odpowiedzialnego za kształtowanie proteomu. Zatem, można stwierdzić, że rolą multiplikacji białek P jest funkcjonalne sprzężenie z jakościowym aspektem działania rybosomu, tj. dekodowaniem informacji genetycznej.

ABSTRACT

The PhD dissertation is focused on the role of ribosomal P proteins, which are the main protein elements in the eukaryotic GTPase Associated Centre. This centre is located on a large ribosomal subunit and its function is to bind and stimulate the GTPase activity of translational factors, i.e. trGTPases. GAC is involved in the release of energy accumulated in GTP. This energy is the main driving force in the ribosome function and ensures the unidirectional nature of the translation process. Eukaryotic P proteins form two hetero-dimers P1-P2, which do not interact directly with ribosomal RNA but bind to the ribosome via the uL10 protein and thus form a pentameric uL10-(P1-P2)₂ complex. This complex in yeast cells has a modified configuration uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A). A unique feature of the proteins included in the complex is the multiplication of P proteins containing a conserved C-terminus responsible for the direct interaction with trGTPases. There are five identical C-terminal fragments in the eukaryotic complex: four originating from two P1-P2 dimers and the fifth from the P domain in the uL10 protein. The presence of only one such element on the ribosome is sufficient for stimulation of translational factor-dependent *in vitro* GTP hydrolysis, which ensures cell viability.

The aim of the research is to determine the function of eukaryotic P proteins in the respective stages of the translation process and, primarily, the role of multiplication of these proteins in the function of the translational machinery.

Saccharomyces cerevisiae yeast cells were used as a research model, i.e. a set of mutants based on the BY4741 strain, which were characterised by a modified configuration of the P protein complex. Three yeast strains were used: BY4741 with an unchanged uL10-(P1A-P2B)(P1B-P2A) complex and mutants uL10_{Δh2} and uL10_{Δh1h2} with a uL10-(P1A-P2B) and uL10 complex configuration, respectively. The implementation of the research tasks was commenced with phenotypic characterisation of the yeast mutants. It was found that yeast strain uL10_{Δh1h2} with ribosomes devoid of all P proteins exhibited a slow growth rate. It was revealed with the use of a flow cytometer that the mutant exhibited disturbances in the G1 phase of the cell cycle, which resulted in a significantly prolonged time of yeast cell generation. Additionally, the phenotypic analyses revealed that mutant uL10_{Δh1h2} had a metabolic defect, i.e. it did not utilise the so-called non-fermentable carbon sources, e.g. ethanol or glycerol. The next steps

consisted in description of the translational machinery function in quantitative and qualitative aspects. Quantitative analyses involved determination of the translation efficiency at its individual stages using such approaches as “polysome profiling”, including “runoff” and “half transit time” analyses. The investigations demonstrated that the absence of P proteins on the ribosome did not impair translation efficiency at the respective stages of the translational cycle. However, the most puzzling result was provided by the qualitative analysis, which showed that ribosomes with a defective P-protein complex exhibited impaired accuracy of genetic information decoding. The analyses were carried out based on the *Dual Luciferase Assay Reporter System*. It was demonstrated that the disturbances in the complex architecture had an impact primarily on the decoding process, i.e. amino acid *misincorporation*, “read-through” stop codon suppression, or shifting the reading frame by 1 nucleotide towards 3’, i.e. the so-called “*frameshifting*”. The results of the analyses based on the luciferase reporter system are supported by the observations indicating that the yeast mutant devoid of the P protein is hypersensitive to antibiotics from the aminoglycoside group, which impair the decoding process in translation. This demonstrates a synergistic effect between the decoding defect associated with the P protein deficiency and the aminoglycoside applied. Importantly, these analyses reveal a correlation between the number of copies of P proteins on the ribosome and the accuracy of the genetic information translation by the ribosome. Depletion of a single dimer P1-P2 on the ribosome is only a moderate decoding defect, whereas the absence of two dimers increases the frequency of ribosome errors. Moreover, the analyses of the operation of the translational machinery demonstrated that the yeast mutant with disorders in the architecture of the P protein complex acquired resistance to sordarin, i.e. a specific antifungal antibiotic.

The doctoral dissertation research showed that the multiplication of P proteins, and mainly the presence of the five characteristic C-terminal fragments of P1/P2 proteins and the uL10 protein, plays an important role in the process of genetic information decoding. Therefore, it can be concluded that the main role of P protein multiplication is the functional coupling with the qualitative aspect of the ribosome action, i.e. genetic information decoding. The level of these proteins does not influence the ribosome biogenesis process or the efficiency of initiation or elongation in the translational cycle. Additionally, these studies indicate that the P

protein complex may play an important role in the interaction of sordarin with the ribosome. This result paves the way for elucidation of the molecular basis of the effect of sordarin on the translational machinery and, hence, development of effective anti-fungal antibiotics.

Wyniki pracy doktorskiej są przedmiotem:

- publikacji

Wawiórka, L., Molestak E., Szajwaj, M., Michalec-Wawiórka, B., Mołoń M., Borkiewicz, L., Grela P., Boguszewska A., Tchórzewski, M., The multiplication of ribosomal P-stalk proteins contributes to the fidelity of translation. *Mol. Cell. Biol.* **37**, MCB.00060-17 (2017).

- konferencji naukowej (posteru)

Molestak E., Wawiórka L., Szajwaj M., Michalec-Wawiórka B., Mołoń M., Horbowicz P., Borkiewicz L., Grela P., Boguszewska A., Tchórzewski M., The multiplication of ribosomal P-stalk proteins contributes to the fidelity of translation. EMBO Conference: Protein Synthesis and Translational Control. 6-9 September 2017 Heidelberg, Germany.

Badania wykonywane w ramach niniejszej pracy doktorskiej były finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki OPUS (UMO-2014/13/B/NZ1/00953).

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje doświadczalne (z listy ICR)

1. Wawiórka, L., Molestak E., Szajwaj, M., Michalec-Wawiórka, B., Mołoń M., Borkiewicz, L., Grela P., Boguszevska A., Tchórzewski, M., 2017, „The multiplication of ribosomal P-stalk proteins contributes to the fidelity of translation” **Mol. Cell. Biol.** **37**, DOI: MCB.00060-17 (IF_{5Y}=4,48)
2. Wawiórka L., Molestak E., Szajwaj M., Michalec-Wawiórka B., Boguszevska A., Borkiewicz L., Liudkovska V., Kufel J., Tchórzewski M., Functional analysis of the uL11 protein impact on translational machinery, **Cell Cycle** DOI:10.1080/15384101.2016.1154245 (IF_{5Y}=3,79)
3. Michalec-Wawiórka B., Wawiórka L., Deryło K., Krokowski D., Boguszevska A., Molestak E., Szajwaj M., Tchórzewski M., "Molecular behavior of human Mrt4 protein, MRT04, in stress conditions is regulated by its C-terminal region", **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2015, 69, 233-240. (IF_{5Y}=3,81)
4. Wolska-Mitaszko B., Molestak E., Małek W., 2005, “Properties of trehalase from different organs of alfalfa, *Medicago sativa*”, **Acta Physiologiae Plantarum**, 27, 1, 53-60(IF=1,67)
5. Wolska-Mitaszko B., Molestak E., 2002, „Mg-ATP w regulacji aktywności trehalazy z *Medicago sativa*”, **Journal of Elementology**, 7, 4, 294-299. (IF=0,76)
6. Molestak E. Wolska-Mitaszko B., 2002, „Właściwości inwertazy z *Medicago sativa*”, **Journal of Elementology**, 7, 4, 288-293. (IF=0,76)

VI. LITERATURA

1. Nierhaus K. H., Wilson, D. N. Protein Synthesis and Ribosome Structure. *Synthesis (Stuttg)*. (2004).
2. Frank, J. The mechanism of translation. *F1000 Research* **6**, 198 (2017).
3. Ramakrishnan, V. The Ribosome Emerges from a Black Box. *Cell* 979–984 (2014).
4. Liljas, A., Ehrenberg, M. Structural aspect of protein synthesis. 2nd. *World Scientific (Singapore)*. (2013)
5. Spahn, C. M. T., Beckmann, R., Eswar, N., Peneczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., Frank, J. Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae* - tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* **107**, 373–386 (2001).
6. Jenner, L. Melnikov, S., Garreau de Loubresse, N., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Iskakova, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G., Yusupov, M., Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 759–767 (2012).
7. Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**, 1234–1242 (2009).
8. Wintermeyer, W. & Rodnina, M. Ribosomal protein synthesis. *Biopolym. Online* 1–10 (2005).
9. Yusupov, M. M. Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., Noller, H. F. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* . **292**, 883–896 (2001).
10. Polacek, N. & Mankin, A. S. The ribosomal peptidyl transferase center: Structure, function, evolution, inhibition. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **40**, 285–311 (2005).
11. Gonzalo, P. & Reboud, J. P. The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome. *Biol. Cell* **95**, 179–193 (2003).
12. Ramakrishnan, V. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**, 557–572 (2002).
13. Lang, K., Erlacher, M., Wilson, D. N., Micura, R. & Polacek, N. The Role of 23S Ribosomal RNA Residue A2451 in Peptide Bond Synthesis Revealed by Atomic Mutagenesis. *Chem. Biol.* **15**, 485–492 (2008).
14. Sievers, A., Beringer, M., Rodnina, M. V. & Wolfenden, R. The ribosome as

- an entropy trap. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 7897–7901 (2004).
15. Voorhees, R. M., Weixlbaumer, A., Loakes, D., Kelley, A. C. & Ramakrishnan, V. Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 528–533 (2009).
 16. Beringer, M. & Rodnina, M. V. The Ribosomal Peptidyl Transferase. *Mol. Cell* **26**, 311–321 (2007).
 17. Maracci, C., Wohlgemuth, I. & Rodnina, M. V. Activities of the peptidyl transferase center of ribosomes lacking protein L27. *RNA* **21**, 2047–2052 (2015).
 18. Fischer, N., Neumann, P., Bock, L. V., Maracci, C., Wang, Z., Paleskava, A., Konevega, A. L., Schröder, G., Grubmüller, H., Ficner, R., Rodnina, M. V., Stark, H. The pathway to GTPase activation of elongation factor SelB on the ribosome. *Nature* **540**, 80–85 (2016).
 19. Maracci, C. & Rodnina, M. V. Review: Translational GTPases. *Biopolymers* **105**, 463–475 (2016).
 20. Diaconu, M., Kothe, U., Schlünzen, F., Fischer, N., Harm, J. M., Tonevitsky, A. G., Stark, H., Rodnina, M. V., Wahl, M. C. Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell* **121**, 991–1004 (2005).
 21. Wahl, M. C. & Möller, W. Structure and function of the acidic ribosomal stalk proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **3**, 93–106 (2002).
 22. Ballesta, J. P. G. & Remacha, M. The Large Ribosomal Subunit Stalk as a Regulatory Element of the Eukaryotic Translational Machinery. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **55**, 157–193 (1996).
 23. Rodnina, M. V., Stark, H., Savelsbergh, A., Wieden, H. J., Mohr, D., Matassova, N. B., Peske, F., Daviter, T., Gualerzi, C. O., Wintermeyer, W., GTPase Mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. *Biol. Chem.* **381**, 377–387 (2000).
 24. Szewczak, A. A., Moore, P. B., Chang, Y. L. & Wool, I. G. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9581–5 (1993).
 25. García-Ortega, L., Álvarez-García, E., Gavilanes, J. G., Martínez-del-Pozo, Á. & Joseph, S. Cleavage of the sarcin-ricin loop of 23S rRNA differentially

- affects EF-G and EF-Tu binding. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4108–4119 (2010).
26. May, K. L., Yan, Q. & Tumer, N. E. Targeting ricin to the ribosome. *Toxicon* **69**, 143–151 (2013).
27. Li, X. P. & Tumer, N. E. Differences in ribosome binding and sarcin/ricin loop depurination by shiga and ricin holotoxins. *Toxins (Basel)*. **9**, 1–12 (2017).
28. Shi, W. W., Tang, Y. S., Sze, S. Y., Zhu, Z. N., Wong, K. B., Shaw, P. Ch. Crystal structure of ribosome-inactivating protein ricin a chain in complex with the C-terminal peptide of the ribosomal stalk protein P2. *Toxins (Basel)*. **8**, (2016).
29. Zhou, Y., Li, X. P., Kahn, J. N. & Tumer, N. E. Functional assays for measuring the catalytic activity of ribosome inactivating proteins. *Toxins (Basel)*. **10**, (2018).
30. Shi, X., Khade, P. K., Sanbonmastu, K. Y., Joseph, S. Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23S rRNA in the elongation cycle of protein synthesis. NIH Public Access. *J Mol Biol.* **419**, 125–138 (2013).
31. Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H. D., Dinman, J. D., Dragon, F., Ellis, S. R., Lafontaine, D. L. J., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J. M., McAlear, M. A., Moore, P. B., Noller, H. F., Ortega, J., Panse, V. G., Ramakrishnan, V., Spahn, Ch. M. T., Steitz, T. A., Tchorzewski, M., Tollervey, D., Warren, A. J., Williamson, J. R., Wilson, D., Yonath, A., Yusupov, M. A new system for naming ribosomal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **24**, 165–169 (2014).
32. Briceño, V., Camargo, H., Remacha, M., Santos, C. & Ballesta, J. P. G. Structural and functional characterization of the amino terminal domain of the yeast ribosomal stalk P1 and P2 proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1315–1322 (2009).
33. Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Santos, C., Briones, E., Zambrano, R., Gabriele, M. A. R., Ballesta, J. P. G., Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 959–968 (1995).
34. Krokowski, D., Tchorzewski, M., Boguszevska, A. & Grankowski, N. Acquisition of a stable structure by yeast ribosomal P0 protein requires binding of P1A-P2B complex: In vitro formation of the stalk structure. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1724**, 59–70 (2005).

35. Davydov, I. I., Wohlgemuth, I., Artamonova, I. I., Urlaub, H., Tonevitsky, A. G., Rodnina, M. V. Evolution of the protein stoichiometry in the L12 stalk of bacterial and organellar ribosomes. *Nat. Commun.* **4**, 1310–1387 (2013).
36. Gordiyenko, Y., Videler, H., Zhou, M., McKay, A. R., Fucini, P., Biegel, E., Müller, V., Robinson, C. V. Mass Spectrometry Defines the Stoichiometry of Ribosomal Stalk Complexes across the Phylogenetic Tree. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 1774–1783 (2010).
37. Maki, Y., Hashimoto, T., Zhou, M., Naganuma, T., Ohta, J., Nomura, T., Robinson, C. V., Uchiumi, T. Three binding sites for stalk protein dimers are generally present in ribosomes from archaeal organism. *J. Biol. Chem.* **282**, 32827–32833 (2007).
38. Grela, P., Bernado, P., Svergun, D., Kwiatowski, J., Abramczyk, D., Grankowski, N., Tchórzewski, M. Structural relationships among the ribosomal stalk proteins from the three domains of life. *J. Mol. Evol.* **67**, 154–167 (2008)..
39. Wiley, J. The list of Cytoplasmic Ribosomal Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Functional Analysis Reports* **477**, 471–477 (1998).
40. 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 - Mol. Cell Res.* **1499**, 63–73 (2000).
41. 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 - Gen. Subj.* **1672**, 214–223 (2004).
42. Zurdo, J., Parada, P., van den Berg, A., Nusspaumer, G., Jimenez-Diaz, A., Remacha, M., Ballesta, J. P. G. Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk: Binding of p1 proteins is required for the interaction of p2 proteins. *Biochemistry* **39**, 8929–8934 (2000).
43. Guarinos, E., Remacha, M. & Ballesta, J. P. G. Asymmetric Interactions between the Acidic P1 and P2 Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Ribosomal Stalk. *J. Biol. Chem.* **276**, 32474–32479 (2001).
44. Choi, A. K. H., Wong, E. C. K., 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 (Basel)*. **7**, 638–647 (2015).
45. Grela, P., Krokowski, D., Gordiyenko, Y., Krowarsch, D., Robinson, C. V., Otlewski, J., Grankowski, N., Tchórzewski, M.. Biophysical properties of the eukaryotic ribosomal stalk. *Biochemistry* **49**, 924–933 (2010).
 46. Rich, B. E. & Steitz, J. A. Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4065–4074 (1987).
 47. Tchórzewski, M. The acidic ribosomal P proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 911–915 (2002).
 48. Hasler, P., Brot, N., Weissbach, H., Parnassa, A. P. & Elkon, K. B. Ribosomal proteins P0, P1, and P2 are phosphorylated by casein kinase II at their conserved carboxyl termini. *J. Biol. Chem.* **266**, 13815–13820 (1991).
 49. Grela, P., Helgstrand, M., Krokowski, D., Boguszevska, A., Svergun, D., Liljas, A., Bernado, P., Grankowski, N., Akke. M., Tchórzewski, M. Structural characterization of the ribosomal P1A-P2B protein dimer by small-angle X-ray scattering and NMR spectroscopy. *Biochemistry* **46**, 1988–1998 (2007).
 50. Tchórzewski, M., Krokowski, D., Boguszevska, A., Liljas, A. & Grankowski, N. Structural characterization of yeast acidic ribosomal P proteins forming the P1A - P2B heterocomplex. *Biochemistry* **42**, 3399–3408 (2003).
 51. Lee, K. M., Yu, C. W. H., Chiu, T. Y. H., Sze, K. H., Shaw, P. CH., 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.* **40**, 3172–3182 (2012).
 52. Lee, K. M., Yusa, K., Chu, L. O., Chu, C. W. H., Oono, M., Miyoshi, T., Ito, K., Shaw, P. Ch., Wong, K. B., Uchiumi, T. 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.* **41**, 8776–8787 (2013).
 53. Murakami, R., Singh, Ch. R., Morris, J., Tang, L., Harmon, I., Takasu, A., Miyoshim, T., Ito, K., Asano, K., Uchiumi, T. The interaction between the ribosomal stalk proteins and translation initiation factor 5B promotes

- p translation initiation.
- Mol. Cell. Biol.*
- doi:10.1128/MCB.00067-18 (2018).
54. Ilag, L. L., Videler, H., McKay, A. R., Sobott, F., Fucini, P., Nierhaus, K. H., Robinson, C. V. Heptameric (L12)₆/L10 rather than canonical pentameric complexes are found by tandem MS of intact ribosomes from thermophilic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 8192–8197 (2005).
 55. 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.* **285**, 4747–4756 (2010).
 56. Tchórzewski, M., Boldyreff, B., Issinger, O. G. & 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.* **32**, 737–746 (2000).
 57. Ramirez, C., Shimmin, L. C., Newton, C. H., Matheson, A. T. & Dennis, P. P. Structure and evolution of the L11, L1, L10, and L12 equivalent ribosomal proteins in eubacteria, archaebacteria, and eucaryotes [published erratum appears in Can J Microbiol 1989 Oct;35(10):975]. *Can. J. Microbiol.* **35**, 234–244 (1989).
 58. Rodríguez-Gabriel, M. A., Remacha, M. & Ballesta, J. P. G. The RNA interacting domain but not the protein interacting domain is highly conserved in ribosomal protein P0. *J. Biol. Chem.* **275**, 2130–2136 (2000).
 59. Shimmin, L. C., Ramirez, C., Matheson, A. T. & Dennis, P. P. Sequence alignment and evolutionary comparison of the L10 equivalent and L12 equivalent ribosomal proteins from archaebacteria, eubacteria, and eucaryotes. *J. Mol. Evol.* **29**, 448–462 (1989).
 60. Pérez-Fernández, J., Lalioti, V. S., Ballesta, J. P. G. & Remacha, M. Characterization of interaction sites in the yeast ribosomal stalk components. *Mol. Microbiol.* **46**, 719–729 (2002).
 61. Michalec, B., Krokowski, D., Grela, P., Wawiórka, L., Sawa-Makarska, J., Grankowski, N., Tchórzewski, M. Subcellular localization of ribosomal P0-like protein MRT4 is determined by its N-terminal domain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 736–748 (2010).
 62. Krokowski, D., Boguszewska, A., Abramczyk, D., Liljas, A., Tchórzewski, M., Grankowski, N. Yeast ribosomal P0 protein has two separate binding sites for P1/P2 proteins. *Mol. Microbiol.* **60**, 386–400 (2006).

63. Gomez-Lorenzo, M. G. Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. *EMBO J.* **19**, 2710–2718 (2000).
64. Rosendahl, G. & Douthwaite, S. Ribosomal proteins L11 and L10.(L12)₄ and the antibiotic thiostrepton interact with overlapping regions of the 23 S rRNA backbone in the ribosomal GTPase centre. *Journal of Molecular Biology* **234**, 1013–1020 (1993).
65. Porse, B. T. & Garrett, R. A. Ribosomal mechanics, antibiotics, and GTP hydrolysis. *Cell* **97**, 423–426 (1999).
66. Wang, L., Yang, F., Zhang, D., Chen, Z., Xu, R. M., Nierhaus, K. H., Gong, W., Qin, Y. A conserved proline switch on the ribosome facilitates the recruitment and binding of trGTPases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 403–410 (2012).
67. Wimberly, B. T., Guymon, R., McCutcheon, J. P., White, S. W. & Ramakrishnan, V. A detailed view of a ribosomal active site: the structure of the L11-RNA complex. *Cell* **97**, 491–502 (1999).
68. Wawiórka, L., Molestak, E., Szajwaj, M., Michalec-Wawiórka, B., Boguszevska, A., Borkiewicz, L., Liudkovska, V., Kufel, J., Tchórzewski, M. Functional analysis of the uL11 protein impact on translational machinery. *Cell Cycle* **15**, 1060–1072 (2016).
69. Steitz, T. A. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 242–253 (2008).
70. Dever, T. E. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**, 545–556 (2002).
71. Johansen, J. S., Kavaliauskas, D., Pfeil, S. H., Blaise, M., Cooperman, B. S., Goldman, Y. E., Thirup, S. S., Knudsen, Ch. R., E. coli elongation factor Tu bound to a GTP analogue displays an open conformation equivalent to the GDP-bound form. *Nucleic Acids Res.* **46**, 8641–8650 (2018).
72. Murray, J., Savva, Ch. G., Shin, B. S., Dever, T. E., Ramakrishnan, V., Fernandez, I. S. Structural characterization of ribosome recruitment and translocation by type IV IRES. *Elife* **5**, 1–24 (2016).
73. Gao, Y. G., Selmer, M., Dunhan, Ch., Weixlbaumer, A., Kelley, A. C., Ramakrishnan, V. Structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the pretranslocation state. *Science*. **326**, 694–699 (2009).

74. Datta, P. P., Sharma, M. R., Qi, L., Frank, J. & Agrawal, R. K. Interaction of the G' domain of elongation factor G and the C-terminal domain of ribosomal protein L7/L12 during translocation as revealed by cryo-EM. *Mol. Cell* **20**, 723–731 (2005).
75. Harms, J. M., Wilson, D. N., Schlutzenzen, F., Connell, S. R., Stachelhaus, T., Zaborowska, Z., Spahn, Ch. M. T., Fucin, P. Translational Regulation via L11: Molecular Switches on the Ribosome Turned On and Off by Thiostrepton and Micrococcin. *Mol. Cell* **30**, 26–38 (2008).
76. Clutton-Brock, T. H., Hiraiwai-Hasegawa, M. & Robertson, A. © 198 9 Nature Publishing Group. *Nature* **342**, 189–92 (1989).
77. Santos, C. & Ballesta, J. P. G. Ribosomal Protein P0, Contrary to Phosphoproteins P1 and P2, Is Required for Ribosome Activity and yeast Viability. *J. Biol. Chem.* **269**, 15689–15696 (1994).
78. Briones, E., Briones, C., Remacha, M. & Ballesta, J. P. G. The GTPase center protein L12 is required for correct ribosomal stalk assembly but not for *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J. Biol. Chem.* **273**, 31956–31961 (1999).
79. Mohr, D., Wintermeyer, W. & Rodnina, M. V. GTPase activation of elongation factors Tu and G on the ribosome. *Biochemistry* **41**, 12520–12528 (2002).
80. Santos, C., Ballesta, J. P. G. The highly conserved protein P0 carboxyl end is essential for ribosome activity only in the absence of protein P1 and P2. *The J. Biol. Chemistry.* **270**, 20608–20614 (1995).
81. 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.* **30**, 2620–7 (2002).
82. Baba, K., Tumuraya, K., Tanaka, I., Yao, M. & Uchiumi, T. Molecular dissection of the silkworm ribosomal stalk complex: the role of multiple copies of the stalk proteins. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1–9 (2013).
83. Jiménez-Díaz, A., Remacha, M., Ballesta, J. P. G. & Berlanga, J. J. Phosphorylation of initiation factor eIF2 in response to stress conditions is mediated by acidic ribosomal P1/P2 proteins in *saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **8**, (2013).
84. Bargis-Surgey, P., Lavergne, J. P., Gonzalo, P., Vard, C., Filhol-Cochet, O.,

- Reboud, J. P. Interaction of elongation factor eEF-2 with ribosomal P proteins. *Eur. J. Biochem.* **262**, 606–611 (1999).
85. Ito, K., Honda, T., Suzuki, T., Miyoshi, T., Murakami, R., Yao, M., Uchiumi, T. Molecular insights into the interaction of the ribosomal stalk protein with elongation factor 1 α . *Nucleic Acids Res.* **42**, 14042–14052 (2014).
86. Nomura, N., Honda, T., Baba, K., Naganuma, T., Tanzawa, T., Arisaka, F., Noda, M., Uchiyama, S., Tanaka, I., Yao, M., Uchiumi, T. Archaeal ribosomal stalk protein interacts with translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 3748–3753 (2012).
87. Wallin, G., Kamerlin, S. C. L., Aqvist, J., Energetics of activation of GTP hydrolysis on the ribosome. *Nature Communication* DOI: 10.1038/ncomms2741 (2013).
88. Sanchez-Madrid, F., Reyes, R., Conde, P. & Ballesta, J. P. G. Acidic Ribosomal Proteins from Eukaryotic Cells. *Eur. J. Biochem.* **98**, 409–416 (1979).
89. Voorhees, R. M., Schmeing, T. M., Kelley, A. C. & Ramakrishnan, V. The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome. *Europe PMC Funders Group* **330**, 835–838 (2013).
90. Zambrano, R., Briones, E., Remacha, M. & Ballesta, J. P. G. Phosphorylation of the acidic ribosomal P proteins in *Saccharomyces cerevisiae*: A reappraisal. *Biochemistry* **36**, 14439–14446 (1997).
91. Ballesta, J. P. G., Rodriguez-Gabriel, M. A., 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.* **23**, 537–550 (1999).
92. Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Bermejo, B., Rodriguez-Gabriel, M. A., Guarinos, E., Ballesta, J. P. G. Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4754–62 (1995).
93. Kryndushkin, D. S., Smirnov, V. N., Ter-Avanesyan, M. D. & Kushnirov, V. V. Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors, and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions. *J. Biol. Chem.* **277**, 23702–23708 (2002).

94. Zinker, S., Warner, J. R. The Ribosomal Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chemistry* **251**, 1799–1807 (1976).
95. Boguszewska, A., Tchórzewski, M., Dukowski, P., Winiarczyk, S. & Grankowski, N. Subcellular distribution of the acidic ribosomal P-proteins from *Saccharomyces cerevisiae* in various environmental conditions. *Biol. Cell* **94**, 139–146 (2002).
96. Tusurgi, K., Ogata, K. Evidence for the Exchangeability of Acidic Ribosomal Proteins on Cytoplasmic Ribosomes in Regenerating Rat Liver *J. Biochem.* **98**, 1427–1431 (1985).
97. Cárdenas, D. Revuelta-Cervantes, J., Jimenez-Diaz, A., Camargo, H., Remacha, M., Ballesta, J. P. G. P1 and P2 protein heterodimer binding to the P0 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is relatively non-specific and a source of ribosomal heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4520–4529 (2012)..
98. Wool, I. G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 164–165 (1996).
99. 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.* **119**, 121–124 (2002).
100. Sun, K., Liu, W., Tang, S., Hsieht, C. T. S. & Hant, T. W. U. T. S. The expression of acidic ribosomal phosphoproteins on the surface membrane of different tissues in autoimmune and normal mice which are the target molecules for anti-double-stranded DNA antibodies. *Immunology* **87**, 362–371 (1996).
101. Koren, E., Reichlin, M. W., Koscec, M., Fugate, R. D. & Reichlin, M. Autoantibodies to the ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related target on human cells. *J. Clin. Invest.* **89**, 1236–1241 (1992).
102. Nishida, J., Shiratsuchi, A., Nadano, D., Sato, T. A. & Nakanishi, Y. Structural change of ribosomes during apoptosis: Degradation and externalization of ribosomal proteins in doxorubicin-treated Jurkat cells. *J. Biochem.* **131**, 485–493 (2002).
103. 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.* **1865**, 34–47 (2018).

104. Yacoub, A., Kelley, M. R. & Deutsch, W. A. Drosophila ribosomal protein P0 contains apurinic/apyrimidine endonuclease activity, *Nucleic Acids Res.* **24**, 4298–4303 (1996).
105. Grabowski, D. T., Deutsch, W. A., Derda, D. & Kelley, M. R. Drosophila AP3, a presumptive DNA repair protein, is homologous to human ribosomal associated protein PO. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4297 (1991).
106. Frolov, M. V. & Birchler, J. A. Mutation in P0, a dual function ribosomal protein/apurinic/apyrimidinic endonuclease, modifies gene expression and position effect variegation in Drosophila. *Genetics* **150**, 1487–1495 (1998).
107. Borden, K. L., Campbelldwyer, E. J., Carlile, G. W., Djavani, M. & Salvato, M. S. Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J. Virol.* **72**, 3819–26 (1998).
108. Borden, K. L., Campbell Dwyer, E. J., Salvato, M. S. NIH Public Access. *FEBS Lett.* **418**, 30–34 (1997).
109. Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H. J., Buck, F., Richter, D., Kindler, S., Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem. J.* **384**, 239–246 (2004).
110. Meier, S., Bell, M., Lyons, D. N., Ingram, A., Chen, J., Gensel, J. C., Zhu, H., Nelson, P. T., Abisambra, J. F. Identification of Novel Tau Interactions with Endoplasmic Reticulum Proteins in Alzheimer's Disease Brain. *J Alzheimers Dis.* **48**, 687–702 (2016).
111. Bisbal, M., Wojnacki, J., Peretti, D., Ropolo, A., Sesma, J., Jausoro, I., Caceres, A. KIF4 mediates anterograde translocation and positioning of ribosomal constituents to axons. *J. Biol. Chem.* **284**, 9489–9497 (2009).
112. Xia, C., Bao, Z., Tabassam, F., Ma, W., Qiu, M., Hua, S., Liu, M. GCIP, a novel human Grap2 and cyclin D interacting protein, regulates E2F-mediated transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 20942–20948 (2000).
113. 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* **27**, 332–338 (2008).
114. Bei, R., Masuelli, L., Trono, P., Orvietani, P. L., Losito, S., Marzocchella, L., Vitolo, D., Albonici, L., Mrozek, M. A., Di Gennaro, E., Lista, F., Faggioni,

- G., Ionna, F., Binaglia, L., Manzari, V., Budillon, A., Modesti, A. The ribosomal P0 protein induces a spontaneous immune response in patients with head and neck advanced stage carcinoma that is not dependent on its overexpression in carcinomas. *Int. J. Oncol.* **31**, 1301–1308 (2007).
115. Barnard, G.F., Staniunas R. J., Bao, S., Manine, K., Steele, G. D., Gollan, J. L., Chen, L. B. Increased expression of human ribosomal phosphoprotein P0 messenger RNA in hepatocellular carcinoma and colon carcinoma. *Cancer Res.* **52**, 3067–3072 (1992).
116. Smith, L., Welham, K. J., Watson, M. B., Drew, P. J., Lind, M. J., Cawkwell, L. The proteomic analysis of cisplatin resistance in breast cancer cells. *Oncol.Res.* **16**, 497–506 (2007).
117. Artero-Castro, A., Castellvi, J., García, A., Hernández, J., Cajal, S. R., LLeonart M. E. Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors. *Hum. Pathol.* **42**, 194–203 (2011).
118. Elkon, B. K. B., Parnassa, A. P. & Foster, C. L. E. E. Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J. Exp. Med.* **162**, 459–471 (1985).
119. Elkon, K., Bonfa, E., Skelly, S., Weissbach, H. & Brot, N. Ribosomal protein autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Biol Chem.* **T7**, 258–261 (1987).
120. Bonfa, E. & Elkon, K. B. Clinical and serologic associations of the antiribosomal P protein antibody. *Arthritis Rheum.* **29**, 981–985 (1986).
121. Bonfa, E., Golombek, S. J., Kaufman, L. D., Skelly, S., Weissbach, H., Brot, N., Elkon, K. B. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies *N. Engl. J. Med.* **317**, 265–271 (1987).
122. Reichlin, M. Ribosomal P antibodies and CNS lupus. *Lupus* **12**, 916–918 (2003).
123. Zampieri, S., Mahler, M., Blüthner, M., Qiu, Z., Malmegrim, K., Ghirardello, A., Doria, A., van Venrooij, W. J., Raats, J. M. H. Recombinant anti-P protein autoantibodies isolated from a human autoimmune library: Reactivity, specificity and epitope recognition. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 588–598 (2003).
124. Rayno, K. & Reichlin, M. Evaluation of assays for the detection of autoantibodies to the ribosomal P proteins. *Clin. Immunol.* **95**, 99–103 (2000).
125. Nafziger, D. A., Recinos, R. F., Hunter, C. A. & Donelson, J. E. Patients infected with *Leishmania donovani* chagasi can have antibodies that recognize

- heat shock and acidic ribosomal proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 325–328 (1991).
126. 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.* **41**, 89–96 (2003).
127. Pasoto, S. G., Viana, V. S. T. & Bonfa, E. The clinical utility of anti-ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 1493–1503 (2014).
128. Wawiórka, L., Krokowski, D., Gordiyenko, Y., Krowarsch, D., Robinson, C. V., Adam, I., Grankowski, N., Tchórzewski, M. In vivo formation of *Plasmodium falciparum* ribosomal stalk - A unique mode of assembly without stable heterodimeric intermediates. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**, 150–158 (2015).
129. Stirpe, F. Ribosome-inactivating proteins. *Mol. Neurosurg. With Target. Toxins* **44**, 9–29 (2005).
130. Too, P. H. M., Ma, M., Mak, A. N., Wong, Y. T., Tung, C. K., Zhu, G., Au, S. W., Shaw, P. C. 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.* **37**, 602–610 (2009)..
131. Chan, D. S. B., Chu, L. O., Lee K. M., Too, P. H., Ma, K. W., Sze, K. H., Zhu, G., Shaw, P. C., Wong, K. B. Interaction between trichosanthin, a ribosome-inactivating protein, and the ribosomal stalk protein P2 by chemical shift perturbation and mutagenesis analyses. *Nucleic Acids Res.* **35**, 1660–1672 (2007).
132. Shaw, P. C., Wong, K. B., Chan, D. S. B. & Williams, R. L. Structural basis for the interaction of [E160A-E189A]-trichosanthin with adenine. *Toxicon* **41**, 575–581 (2003).
133. Green, M. R. & Sambrook, J. *Chapter I, Isolation and Quantification of DNA. Molecular cloning, A laboratory manual* **1**, (2012).
134. Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 2172–2175 (1989).
135. Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. Applications of high efficiency lithium acetate

- p>transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier.
- Yeast*
- 7**
- , 253–263 (1991).
136. Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M. & Herrero, E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 837–848 (1997).
 137. Minois, N., Frajnt, M., Wilson, C. & Vaupel, J. W. Advances in measuring lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 402–406 (2005).
 138. Renata Zadrag, G. B. and T. B. Is the Yeast a Relevant Model for Aging of Multicellular Organisms? An Insight from the Total Lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Aging Sci.* **1**, 159–165 (2008).
 139. Molon, M. & Zebrowski, J. Phylogenetic relationship and Fourier-transform infrared spectroscopy-derived lipid determinants of lifespan parameters in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *FEMS Yeast Res.* **17**, 1–10 (2017).
 140. Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, L., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., Meyuhas, O. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* **19**, 2199–2211 (2005).
 141. Harger J. W., Dinman J. D. An in vivo dual-luciferase assay system for studying translational recoding in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Methods* **9**, 1019–1024 (2003).
 142. Salas-Marco, J. & Bedwell, D. M. Discrimination between defects in elongation fidelity and termination efficiency provides mechanistic insights into translational readthrough. *J. Mol. Biol.* **348**, 801–815 (2005).
 143. Plant, E. P., Nguyen, P., Russ, J. R., Pittman, Y. R., Nguyen, T., Quesinberry, J. T., Kinzy, T. G., Dinman, J. D., Differentiating between Near- and Non-Cognate Codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **2**, (2007).
 144. Laemmli U. K., Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**, 680–685 (1970).
 145. Towbin, H., Staehelint, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications (ribosomal proteins/radioimmunoassay/fluorescent antibody assay/peroxidase-conjugated antibody/autoradiography). *Biochemistry* **76**, 4350–4354 (1979).

146. van der Zeijst, B. A. M., Kool, A. J. & Bloemers, H. P. J. Isolation of Active Ribosomal Subunits from Yeast. *Eur. J. Biochem.* **30**, 15–25 (1972).
147. Spahn, C. M. T., Gomez- Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jorgensen, R., Andersen, R. A., Beckmann, R., Penczek, P. A., Ballesta, J. P. G., Frank, J. Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J.* **23**, 1008–1019 (2004).
148. Justice, M. C., Hsu, M. J., Tse, B., Ku, T., Balkovec, J., Schmatz, D., Nielsen, J. Elongation Factor 2 as a Novel Target for Selective Inhibition of Fungal Protein Synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 3148–3151 (1998).
149. Gomez-Lorenzo M. G., Garcia-Bustos J. F., Ribosomal P-protein Stalk Function Is Targeted by Sordarin Antifungals. *J. Bio. Chem.* **273**, 25041–25044 (1998).
150. Guo, H. Specialized ribosomes and the control of translation. *Biochemical Society Transactions* doi.org/10.1042/BST20160426 ,1–15 (2018).
151. Shi, Z. & Barna, M. Translating the Genome in Time and Space : Specialized Ribosomes, RNA Regulons, and RNA-Binding Proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **31**, 1–24 (2015).
152. Rodnina, M. V., Fischer, N., Maracci, C. & Stark, H. Ribosome dynamics during decoding. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **372**, (2017).
153. Rodnina, M. V. The ribosome in action : Tuning of translational efficiency and protein folding. *Protein Science* **25**, 1390–1406 (2016).
154. Zhou, D., Li, X. P., Kahn, J. N., Tumer, N. E. Phosphorylation of eIF2 Directs ATF5 Translational Control in Response to Diverse Stress Conditions *J. Biol. Chem.* **283**, 7064–7073 (2008).
155. Vattam, K. M. & Wek, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *PNAS* **101**, 11269–11274 (2004).
156. Teleman, A. A., Chen, Y. & Cohen, S. M. 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *GENES & DEVELOPMENT* **19**, 1844–1848 (2005).
157. Hinnebusch, A. G. Translational Regulation of GCN4 and the General Amino Acid Control of Yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 407–450 (2005).
158. Underwood, K. A., Swartz, J. R. & Puglisi, J. D. Quantitative Polysome Analysis Identifies Limitations in Bacterial Cell-Free Protein Synthesis.

- BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* **91**, , 425-435 (2005).
159. Brandt, F., Etchells, S. A., Ortiz, J. O., Elcock, A. H. & Hartl, F. U. The Native 3D Organization of Bacterial Polysomes. *Cell* **136**, 261–271 (2009).
 160. Simsek, D. & Barna, M. An emerging role for the ribosome as a nexus for post- translational modifications. *Curr Opin Cell Biol.***45**, 92–101 (2017).
 161. Wohlgemuth, I., Pohl, C. & Rodnina, M. V. Optimization of speed and accuracy of decoding in translation. *EMBO J.* **29**, 3701–3709 (2010).
 162. Gromadski, K. B., Daviter, T. & Rodnina, M. V. A Uniform Response to Mismatches in Codon-Anticodon Complexes Ensures Ribosomal Fidelity. *Molecular Cell* **21**, 369–377 (2006).
 163. Shao, S., Murray, J., Brown, A., Taunton, J., Ramakrishnan, V., Hegde, R. S. Decoding Mammalian Ribosome-mRNA States by Article Decoding Mammalian Ribosome-mRNA States by Translational GTPase Complexes. *Cell* **167**, 1229–1240 (2016).
 164. Voorhees, R. M. & Ramakrishnan, V. Structural Basis of the Translational Elongation Cycle. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 203–236 (2013).
 165. Grela, P., Sawa-Makarska, J., Gordiyenko, Y., Robinson C. V., Grankowski, N., Tchórzewski, M. Structural properties of the human acidic ribosomal P proteins forming the P1-P2 heterocomplex. *J. Biochem.* **143**, 169–177 (2008).
 166. Savelsbergh, A., Mohr, D., Kothe, U., Wintermeyer, W. & Rodnina, M. V. Control of phosphate release from elongation factor G by ribosomal protein L7 / 12. **24**, 4316–4323 (2005).
 167. Stark, H., Rodnina, M. V, Rinke-Appel, J., Heel, M. Visualization of elongation factor Tu on the Escherichia coli ribosome. *Nature* **389**, 403–406 (1997).
 168. Tanzawa, T., Kato, K., Girodat, D., Ose, T., Kumakura, Y., Wieden, H. J., Uchiumi, T., Tanaka, I, Yao, M., The C-terminal helix of ribosomal P stalk recognizes a hydrophobic groove of elongation factor 2 in a novel fashion. *Nucleic Acids Res.* **46**, 1–13 (2018).
 169. Blanchard, S. C., Kim, H. D., Gonzalez, R. L., Puglisi, J. D. & Chu, S. tRNA dynamics on the ribosome during translation. *PNAS* **101**, 12893-12898 (2004).
 170. Kothe, U., Wieden, H., Mohr, D. & Rodnina, M. V. Interaction of Helix D of Elongation Factor Tu with Helices 4 and 5 of Protein L7 / 12 on the Ribosome. 1011–1021 (2004). doi:10.1016/j.jmb.2003.12.080

171. 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.* **20**, 1077–1084 (2013).
172. Grela, P., Li, X. P., Horbowicz, P., a Dźwierzynska, M., Tchórzewski, M., Tumer, N. E. Human ribosomal P1-P2 heterodimer represents an optimal docking site for ricin A chain with a prominent role for P1 C-terminus. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
173. Peske, F., Kuhlenkoetter, S., Rodnina, M. V & Wintermeyer, W. Timing of GTP binding and hydrolysis by translation termination factor RF3. *Nucleic Acids Research* **42**, 1812–1820 (2014).
174. Rodnina, M. V, Goyal, A., Belardinelli, R., Maracci, C. & Mil, P. Directional transition from initiation to elongation in bacterial translation. *Nucleic Acids Research* **43**, 10700–10712 (2015).
175. Savelsbergh, A., Katunin, V. I., Mohr, D., Peske, F., Rodnina, M. V., Wintermeyer, W. An Elongation Factor G-Induced Ribosome Rearrangement Precedes tRNA-mRNA Translocation. *Molecular Cell* **11**, 1517–1523 (2003).
176. Pape, T., Wintermeyer, W. & Rodnina, M. V. Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the E. coli ribosome. *The EMBO Journal* **17**, 7490–7497 (1998).
177. Rodnina, M. V, Pape, T., Fricke, R., Kuhn, L. & Wintermeyer, W. Initial Binding of the Elongation Factor Tu 1/2 GTP 1/2 Aminoacyl-tRNA Complex Preceding Codon Recognition on the Ribosome. *J. Biol. Chem.* **271**, 646–652 (1996).
178. Harger, J. W., Meskauskas, A., Dinman, J. D. & Harger, J. W. An ‘ integrated model ’ of programmed ribosomal frameshifting. *TRENDS in Biochemical Sciences* **27**, 448–454 (2002).
179. Seyedmousavi, S., Rafati, H., Ilkit, M., Tolooe, M., Hedayati, M. T., Verweij, P. Systemic Antifungal Agents: Current Status and Projected Future Developments. *Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* **1508**, 107-139 (2017).
180. Fernández-Pevida, A., Rodríguez-Galán, O., Díaz-Quintana, A., Kressler, D. & De La Cruz, J. Yeast ribosomal protein L40 assembles late into precursor 60 S ribosomes and is required for their cytoplasmic maturation. *J. Biol. Chem.* **287**, 38390–38407 (2012).

181. Elzen, A. M. G. Van Den, Schuller, A., Green, R. & Se, B. Dom 34 -Hbs 1 mediated dissociation of inactive 80 S ribosomes promotes restart of translation after stress. **33**, 265–276 (2014).