

Badania desulfuracji 2-tiourydyn w kontekście uszkodzeń tRNA w warunkach stresu oksydacyjnego.

Kierownik projektu: prof. dr hab. Barbara Nawrot

Współpraca: prof. dr hab. Elżbieta Sochacka (Politechnika Łódzka)

Projekt NCN OPUS (2012-2015)

Opis projektu

Celem projektu było zbadanie reakcji desulfuracji 2-tiourydyn (S2U) na poziomie nukleozydu, oligorybonukleotydu i całego S2U-tRNA w warunkach stresu oksydacyjnego w oparciu o szerokie spektrum cząsteczek modelowych oraz określenie wpływu produktów desulfuracji na właściwości fizykochemiczne RNA (stabilność hydrolityczna, hybrydyzacja do komplementarnej nici RNA) i funkcję tRNA, a także opracowanie metod wykrywania uszkodzeń RNA (H2U-RNA) i zbadanie czy proces desulfuracji S2U-tRNA zachodzi w systemie komórkowym. Opracowano efektywną transformację 5-podstawionych 2-tiourydyn do ich zdesulfurowanych pochodnych tj. rybozydów 5-podstawionych 4-pirymidynonów. Wykazano, że reakcja desulfuracji 5-podstawionych 2-tiourydyn jest zależna od odczynnika utleniającego, stężenia reagentów, pH środowiska i podstawnika w pozycji 5 reszty 2-tiouracylu i zachodzi poprzez związki pośrednie zawierające reszty siarkowych oksokwasów, tj. kwas sulfenylowego, sulfinyłowego lub sulfonowego. Opracowano syntezę modelowych oligorybonukleotydów zawierających 5-podstawione 2-tiourydyny (R5S2U-RNA) lub nukleozyd 4-pirymidynonu (H2U-RNA). Opracowano wydajną i prostą metodę konwersji R5S2U-RNA do R5H2U-RNA. Wykazano preferencyjne tworzenie dupleksów RNA z parą H2U-G, w porównaniu do pary H2U-A. Jednocześnie wykazano, że dodatek jonów srebra (Ag^+) powoduje podwyższenie trwałości termodynamicznej dupleksu RNA z parą H2U-A ($\Delta T_m = 10^\circ\text{C}$). Wykazano, że oligomery H2U-RNA w środowisku alkalicznym ($\text{pH} > 9.0$) i w środowisku kwaśnym ($\text{pH} \ 3.6$) ulegają hydrolizie w miejscu modyfikacji (depirymidynacja do formy abasic i następne rozerwanie łańcucha RNA). Opracowano metodę izolacji tRNA_{Glu} z hodowli drożdży *S. cerevisiae* za pomocą biotynylowanej sondy DNA, komplementarnej do centralnego fragmentu tRNA. Stwierdzono, że obecność jonów metali (Mn^{2+} , Fe^{2+}) skoordynowanych z układem hemowym ma wpływ na reakcje utleniania nukleozydów znajdujących się w pętli antykodonu, G i S2U. Zidentyfikowano, za pomocą zaawansowanych metod spektrometrii mas (3Q MRM), obecność produktów desulfuracji mcm5S2U-tRNA_{Glu} do mcm5H2U-tRNA_{Glu} i mcm5U-tRNA_{Glu} zachodzącej wewnątrz komórek drożdży poddanych działaniu H_2O_2 w warunkach naśladujących stres oksydacyjny

Publikacje:

Bartos P., Ebenryter-Olbińska K., Sochacka E., Nawrot B. *The influence of the C5 substituent on the 2-thiouridine desulfuration pathway and the conformational analysis of the resulting 4-pyrimidinone products*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, 23, 5587–5594. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.07.030

Sochacka E., Bartos P., Kraszewska K., Nawrot B. *Desulfuration of 2-thiouridine with hydrogen peroxide in the physiological pH range 6.6–7.6 is pH-dependent and results in two distinct products*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 23, 5803–5805. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.08.114

Chwiałkowska A., Wielgus E., Leszczyńska G., Sobczak M., Mikołajczyk B., Sochacka E., Nawrot B. *An efficient approach for conversion of 5-substituted 2-thiouridines built in RNA oligomers into corresponding desulfured 4-pyrimidinone products*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, 25, 3100–3104. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.06.019

Sochacka E., Szczepanowski R.H., Cypryk M., Chwiałkowska A., Nawrot B. i wsp. *2-Thiouracil deprived of thiocarbonyl function preferentially base pairs with guanine rather than adenine in RNA and DNA duplexes*. *Nucleic Acids Research* **2015**, 43(5), 2499–2512. DOI: 10.1093/nar/gkv109

Duechler M., Leszczyńska G., Sochacka E., Nawrot B. *Nucleoside modifications in the regulation of gene expression: focus on tRNA*. *Cell Mol Life Sci.* **2016** Aug;73(16):3075-95. doi: 10.1007/s00018-016-2217-y. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27094388; PMCID: PMC4951516.