

Badanie uszkodzeń 2-tiourydyno-tRNA zachodzących w komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu.

Kierownik grantu: dr Małgorzata Barbara Sierant

Grant NCN, OPUS 12 (2017-2022)

Opis projektu

Celem projektu było zbadanie czy w komórkach eukariotycznych hodowanych w warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do uszkodzeń tRNA, polegających na desulfuracji 5-podstawionej 2-tiourydyny (R5S2U), występującej naturalnie w pozycji „wobble” antykodonu tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} i tRNA^{Gln}, z utworzeniem produktów desulfuracji: rybozydu 4-pirymidynonu (R5H2U) i urydyny (R5U).

Badania prowadzono w trzech systemach komórkowych: 1) w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, 2) w komórkach ludzkich pochodzących z kilkunastu linii ludzkich komórek nowotworowych oraz 3) w komórkach prawidłowych HEK293 (□SOD2, □KAT) z uszkodzonymi metodą CRISPR/Cas9 genami kodującymi białka należące do systemu antyoksydacyjnego: SOD i KAT, wykazującymi brak ekspresji i aktywności tych białek. W celu wywołania stresu oksydacyjnego komórki podczas hodowli poddawano działaniu czynników utleniających, (nadtlenuk wodoru, arsenin sodowy, podchloryn sodu), zastosowanych w stężeniach, w którym nie dochodziło do śmierci komórek. Wyznaczono poziom reaktywnych form tlenu jakie tworzą się w komórkach pod wpływem zastosowanych czynników i mogą być przyczyną uszkodzeń komórkowych kwasów nukleinowych (w tym tRNA) i białek. Zaobserwowano, że zastosowanie warunków oksydacyjnych wobec komórek drożdży powodowało ubytek mcm5S2U w tRNA^{Glu}, co mogło świadczyć o oksydacyjnym uszkodzeniu 2-tiourydyno-tRNA. Opracowano wydajną metodę izolacji czystego tRNA^{Glu} z komórek drożdżowych, za pomocą komplementarnej sondy DNA oraz metodę otrzymywania frakcji tRNA z komórek ludzkich (kolumna Agilent SEC-3 300Å w połączeniu z systemem FPLC AKTA purifier, GE Healthcare). Uzyskany tRNA był poddany enzymatycznej hydrolizie i defosforylowany do mieszaniny nukleozydów, którą analizowano masowo stosując technikę LC-MS/MS. Analizę jakościową i ilościową przeprowadzono bazując na zdefiniowanych syntetycznych wzorcach modyfikowanych nukleozydów typu R5S2U, R5H2U i R5U, gdzie R=mcm, cm, H (aparat QTRAP 6500+ mass spectrometer, sprzężony z chromatografem cieczerowym ExionLC System, SCIEX, USA oraz aparat ZenoTOF 7600 sprzężony z chromatografem cieczerowym ExionLC AC, SCIEX, USA). Najważniejszym osiągnięciem projektu była identyfikacja i ocena ilościowa produktów desulfuracji 5-podstawionej 2-tiourydyny w tRNA wyizolowanym z żywych komórek drożdżowych i ludzkich, poddanych w czasie wzrostu stresowi oksydacyjnemu. Zidentyfikowano produkty desulfuracji: mcm5H2U, cm5H2U, H2U, mcm5U, cm5U oraz wciąż obecne w tRNA nieuszkodzone nukleozydy: mcm5S2U, cm5S2U i S2U. Otrzymane wyniki potwierdziły zakładaną w projekcie hipotezę, że w komórkach eukariotycznych poddanych stresowi oksydacyjnemu

wskutek działania wewnątrz komórek reaktywnych form tlenu (ROS) zachodzi desulfuracja 5-podstawionej 2-tiourydyny.

Publikacje:

Malgorzata Sierant, Patrycja Komar, Rafal Szewczyk, Agnieszka Dziergowska, Elżbieta Sochacka, and Barbara Nawrot.. Studies on the oxidative damage of wobble 5-methylcarboxymethyl-2-thiouridine in transfer RNAs. *Acta Biochimica Pol.* 65, S2, 18, **2018**.

M. Sierant, R. Szewczyk, A. Dziergowska, K. Krolewska-Golinska, E. Sochacka, B. Nawrot. Studies on the 2-thiouridine-tRNA damage induced in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells under oxidative stress conditions. *FEBS OpenBio* 9, S1, 190, **2019**.

M. Sierant, R. Szewczyk, K. Krolewska-Golinska, A. Dziergowska, P. Bernat, E. Sochacka, B. Nawrot. Intracellular damage of mcm5S2U-tRNA induced by oxidative stress. *FEBS Open Bio* 11 (Suppl. 1), 489, **2021**, doi: 10.1002/2211-5463.13205

Sierant M, Szewczyk R, Dziergowska A, Krolewska-Golinska K, Szczupak P, Bernat P, Nawrot B. Studies on the Oxidative Damage of the Wobble 5-Methylcarboxymethyl-2-Thiouridine in the tRNA of Eukaryotic Cells with Disturbed Homeostasis of the Antioxidant System. *Int J Mol Sci.* **2024** Nov 17;25(22):12336. doi: 10.3390/ijms252212336.: