

Wpływ zmiany konformacji i hydrofobowości podjednostki A rycyny na wewnątrzkomórkowy transport tej toksyny

Iwona Sokołowska

Rycyna należy do grupy toksyn pochodzenia roślinnego, które od dawna stanowią przedmiot zainteresowań wielu ośrodków badawczych na całym świecie. Zainteresowanie rycyną wiąże się z możliwością wykorzystania jej jako modelowego związku w badaniach transportu wewnątrzkomórkowego białek, w tym rozpoznawania nieprawidłowo sfałdowanych glikoprotein w retikulum endoplazmatycznym (ER) i ich retrotranslokacji z ER do cytozolu. Wiedza na ten temat ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowego działania wszystkich komórek eukariotycznych.. Ponadto, szczegółowe poznanie mechanizmów transportu wewnątrzkomórkowego rycyny, w tym transportu z ER do cytozolu, daje możliwości wykorzystania tego białka w tworzeniu nowoczesnych immunotoksyn, a także szczepionek.. Obok zastosowania w medycynie, ze względu na swoją wysoką toksyczność, rycyna uznawana jest za potencjalną broń biologiczną. Od wielu lat trwają zatem badania i próby skonstruowania szczepionki, która zniósłaby toksyczne działanie w przypadku zatrucia rycyną.

Rycyna została wcześniej dobrze poznana pod względem jej struktury i aktywności. Składa się ona z dwóch łańcuchów polipeptydowych A i B, połączonych mostkiem dwusiarczkowym, tworzących tzw. holotoksynę (ang. *holotoxin*). Enzymatycznie aktywny łańcuch A (RTA) odpowiada za blokowanie syntezy białek; natomiast łańcuch B (RTB), o właściwościach lektyny, wiąże się do receptorów zawierających terminalną β -1,4-galaktozę. Po związaniu z powierzchnią komórki rycyna ulega endocytozie i dostaje się do wczesnych endosomów. Stąd większość cząsteczek rycyny jest transportowana z powrotem na powierzchnię komórki lub dostarczana do późnych endosomów, a następnie lizosomów, gdzie ulega proteolitycznej degradacji. Około 5% endocytowanej rycyny jest transportowane do aparatu Golgiego, a następnie do retikulum endoplazmatycznego. Wiadomo, że podjednostka A rycyny wykorzystuje mechanizm retrotranslokacji białek w swoim transporcie z ER do cytozolu. Do tej pory nie udało się jednak poznać szczegółowo tego procesu.

W niniejszej pracy wykorzystałam mutagenезę miejscowo-specyficzną w celu otrzymania zmienionej podjednostki A rycyny P250A (RTA_{P250A}). Rejon hydrofobowy podjednostki A rycyny obejmuje 12-aminokwasowy fragment położony między Val245 a Val256 i jak wskazują wyniki dotychczas opublikowanych badań odgrywa znaczącą rolę w

jej cytotoksyczności. W swojej pracy wykazałam, iż zmiana w rejonie hydrofobowym podjednostki A rycyny (P250A) ma znaczący wpływ na podwyższoną lizosomalno-endosomalną degradację tej toksyny, jak również na zmniejszoną wydajność transportu podjednostki A z retikulum endoplazmatycznego do cytozolu. Wpływa to na cytotoksyczność badanej rycyny, która jest znacznie niższa od cytotoksyczności rycyny dzikiego typu, a efekt ten nie jest ograniczony do jednego tylko typu komórek. W swojej pracy badałam także oddziaływania pomiędzy rycyną P250A a białkami retikularnymi EDEM1 i EDEM2. Białka te uczestniczą w rozpoznawaniu nieprawidłowo sfałdowanych glikoprotein w ER i kierowaniu ich na drogę proteasomalnej degradacji. Oba białka uczestniczą także w transporcie podjednostki A rycyny dzikiego typu do cytozolu. W swojej pracy wykazałam, że zarówno EDEM1, jak i EDEM2 nie rozpoznają zmienionej podjednostki A rycyny (P250A). Co istotne, RTA_{P250A} posiada zmienioną strukturę drugorzędową charakteryzującą się większą ilością rejonów α -helikalnych. W pracy tej sugeruję zatem, że zmiana konformacji substratu białkowego ma wpływ na jego rozpoznawanie przez białka z rodziny EDEM.

Ponadto wyniki moich doświadczeń, w których badałam oddziaływania między białkami EDEM1 i EDEM2 a podjednostką A rycyny z obniżoną i podwyższoną hydrofobowością wykazały jednoznacznie, że odpowiednio wysoki stopień hydrofobowości rozpoznawanych determinant białkowych ma wpływ na ich wiązanie z białkami EDEM1 i EDEM2. Co więcej, ta zależność dotyczy nie tylko rycyny. W swojej pracy wykorzystałam również inne modelowe białko, którym była nieprawidłowo sfałdowana trzustkowa β -sekretaza (BACE456), posiadająca w swej C-terminalnej części wysoce hydrofobowy rejon. Obniżenie jego hydrofobowości również wiązało się z obniżonym poziomem oddziaływań z białkami procesu ERAD. Otrzymane wyniki stanowią ważną informację pozwalającą zrozumieć w jaki sposób białka z rodziny EDEM rozpoznają substraty przeznaczone do procesu degradacji.

Podsumowując, wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy poszerzają wiedzę na temat wewnątrzkomórkowego transportu rycyny, udziału rejonu hydrofobowego podjednostki A w mechanizmie funkcjonowania tego białka, a także dostarczają ważnych informacji dotyczących mechanizmu rozpoznawania źle sfałdowanych białek w ER. Wiedza ta może przyczynić się do rozwoju dalszych prac nad poznaniem szczegółowych mechanizmów procesów zachodzących w komórkach oraz może mieć znaczenie w tworzeniu nowych terapii współczesnej medycyny.