

Jednymi z najbardziej toksycznych białek znanych w przyrodzie są białka inaktywujące rybosom (ang. *Ribosome Inactivating Proteins*, RIPs), występują one zarówno w roślinach, bakteriach jak i innych organizmach; są obecne w żywności dla ludzi, są także stosowane w etnomedycynie. Ponadto, białka RIP stanowią duże zagrożenie społeczne, z uwagi na fakt, że mogą być wykorzystane jako broń biologiczna. Toksyny te są nie tylko zagrożeniem dla życia i zdrowia człowieka, ale przyciągają one również uwagę ze względu na szerokie możliwości zastosowania biotechnologicznego w medycynie; jednakże, z punktu widzenia ich tzw. biologii, molekularny mechanizm działania tych toksyn wciąż pozostaje nie wyjaśniony. Większość RIP jest klasyfikowana jako białka jednołańcuchowe (typ 1) lub dwułańcuchowe (typ 2), w których aktywny enzymatycznie łańcuch A jest połączony mostkiem dwusiarczkowym z łańcuchem B (o charakterze lektyny), co zapewnia wysoce skuteczną zdolność wnikania do wnętrza komórek ssaczy. Dlatego też białka RIP typu 2 charakteryzują się znacznie większą toksycznością niż białka RIP typu 1. W obrębie rodziny białek RIP zidentyfikowano również trzecią klasę, określaną jako typ 3, który występuje jako proenzym składający się z pojedynczego polipeptydu, który jest aktywny dopiero po obróbce proteolitycznej. Obecnie przyjęty model działania białek RIP zakłada, że białka te prowadzą depurynację rybosomalnej podjednostki 60S (usuwają jedną zasadę adeninową w pętli sarcyna-rycyna – ang. *Sarcin Ricin Loop*, SRL) - co skutkuje zahamowaniem biosyntezy białka. Uważa się, że blokada syntezy białka leży u podstaw toksyczności białek RIP i jest uważana za główny czynnik śmierci komórki na drodze apoptozy. Należy jednak podkreślić, że nie ma wyraźnego związku pomiędzy depurynacją rybosomu a śmiercią komórki i pomimo wielu lat badań, brak jest obecnie konsensu, co do podstaw wyjaśniających molekularne aspekty toksyczności białek RIP. Zrealizowane prace badawcze w obrębie Katedry Biologii Molekularnej sugerują, że depurynacja rybosomu może mieć inny efekt biologiczny, tj. może indukować tak zwaną odpowiedź na stres rybotoksyczny (ang. *ribotoxic stress response*, RSR), co skutkuje indukcją szlaków sygnałowych prowadzących do apoptozy. Co więcej, nasze obserwacje są również zgodne z ostatnimi odkryciami tzw. zderzających/kolidujących rybosomów (ang. *collided ribosomes*), które działają jako metaboliczny sensor przekazujący informacje do różnych szlaków sygnałowych, niezależnie od blokady translacji, a odpowiedź ta jest zależna od intensywności kolizji i poziomu formowania tzw. disomów.

Opierając się na wstępnych wynikach i opublikowanych oryginalnych danych głównym celem projektu jest wyjaśnienie na poziomie molekularnym i komórkowym konsekwencji działania białek RIP w komórce eukariotycznej, które prowadzi do ich toksyczności. Nasza hipoteza naukowa postuluje, że RIP zostały ewolucyjnie przystosowane do 'przejęcia' maszynierii translacyjnej organizmów eukariotycznych poprzez interakcje ze specyficznymi dla eukariotów rybosomalnymi białkami P i aktywację kaskady stresu (ISR/RSR) na drodze zależnej od formowania się disomu powstałego po depurynacji SLR.

W ramach realizacji projektu proponujemy dwa w pełni uzupełniające się poziomy analityczne. Pierwszy, poziom molekularny *in vitro* – mający na celu zbadanie mechanizmu interakcji między różnymi przedstawicielami rodziny białek RIP a rybosomem (jako głównym celem dla toksyn). Etap ten obejmuje podejścia biochemiczne i biofizyczne (interakcje białko-białko) oraz strukturalne (przy użyciu techniki Cryo-EM). Postulujemy, że białka RIP, pomimo wysokiego poziomu podobieństwa strukturalnego i aktywności enzymatycznej wykazują zróżnicowanie pod względem powodowanych efektów biologicznych - co może przyczynić się do nowego wykorzystania badanych w projekcie RIP. Drugi, poziom badań to poziom komórkowy *in vivo*, który ma na celu precyzyjne zbadanie odpowiedzi komórkowej w reakcji na pojawienie się w komórce białek RIP. W ramach realizacji tego etapu opracowaliśmy szereg innowacyjnych systemów genetycznych, mających na celu ścisłą, regulowaną kontrolę ekspresji białek RIP w komórkach ssaków wykorzystując m.in. unikalny system ekspresji toksyn pozwalający na precyzyjną kontrolę aktywacji RIP na poziomie post-translacyjnym - system ten oparty jest na podziale białka RIP na dwie odseparowane w przestrzeni i czasie indywidualne połówki (co czyni je nieszkodliwymi dla komórki), które w dalszym etapie (w kontrolowany sposób z wykorzystaniem intein) mogą być łączone do przywrócenia ich pełnej funkcjonalności - toksyczności. Opracowane w projekcie systemy umożliwiają po raz pierwszy, szczegółowe badanie fluktuacji metabolicznych wywołanych przez pojawienie się białek RIP w komórkach ssaków, jednocześnie torując drogę do skutecznego opracowania innowacyjnych i bezpiecznych technologii w medycynie m.in. do tzw. celowanej terapii przeciwnowotworowej.