

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Większość komórkowych kwasów rybonukleinowych ulega potranskrypcyjnym modyfikacjom. Do tej pory zidentyfikowano około 150 różnych modyfikacji nukleozydów, z których ponad 90 występuje w transferowym RNA (tRNA). Jednym z ważniejszych miejsc w cząsteczce tRNA jest pozycja 34, określana inaczej jako pozycja 1 antykodonu lub tzw. pozycja wahadłowa antykodonu. Nukleozyd występujący w pozycji wahadłowej tRNA oddziałuje z nukleozydem w pozycji 3 kodonu w mRNA, dzięki czemu informacja genetyczna jest odczytywana prawidłowo i do syntetyzowanego *de novo* łańcucha polipeptydowego przyłączany jest właściwy aminokwas. W pozycji wahadłowej może występować ponad 40 różnych modyfikowanych nukleozydów. Bakteryjny tRNA specyficzny dla lizyny, glutaminy i kwasu glutaminowego zawiera w pozycji wahadłowej 5-podstawione 2-tiourydyny (R5S2U), 5-podstawione 2-selenourydyny (R5Se2U) oraz 5-podstawione S-geranylo-2-tiourydyny (R5geS2U). Za wprowadzenie dwóch ostatnich modyfikacji (R5Se2U oraz R5geS2U) odpowiedzialny jest tytułowy bakteryjny enzym syntaza 2-selenourydyno-tRNA (SelU). Początkowo uważano, że enzym SelU katalizuje w sposób niezależny dwa procesy, reakcję selenowania 2-tiourydyny (S2U→Se2U) w obecności anionu selenofosforanowego (SePO₃³⁻) oraz reakcję geranylowania 2-tiourydyny (S2U→geS2U) w obecności pirofosforanu geranylu (GePP). W 2018 r. wykazaliśmy na modelowych 17-merowych oligorybonukleotydach (ASL, ang. *anticodon-stem-loop*), że reakcje katalizowane za pomocą SelU zachodzą w sposób liniowy, jedna po drugiej. W pierwszym etapie S2U-RNA jest geranylowany, a powstały produkt pośredni geS2U-RNA jest selenowany do Se2U-RNA (S2U-RNA→geS2U-RNA→Se2U-RNA). Powstało w związku z tym pytanie, w jaki sposób enzym SelU rozpoznaje swoje substraty oraz jaki jest mechanizm transformacji R5S2U→R5Se2U w naturalnych bakteryjnych tRNA.

Niniejsza praca doktorska próbuje wyjaśnić to zagadnienie. Prezentowane w niej badania skupiają się na charakterystyce właściwości białka SelU, opisie jego substratów oraz katalizowanych za pomocą tego enzymu reakcji. W badaniach zastosowano enzym otrzymany w postaci fuzyjnej z białkiem wiążącym maltozę (MBP) przyłączonym do N-końca SelU. Otrzymany enzym MBP-SelU wykazywał zdecydowanie lepsze właściwości, takie jak wysoka aktywność enzymatyczna i podwyższona stabilność w porównaniu do stosowanego we wcześniejszych badaniach wariantu SelU-His₆.

Potwierdzono, że enzym SelU jest nukleoproteiną wiążącą tylko geranylowane tRNA. We frakcji tRNA związanej z białkiem zidentyfikowano m.in. mnm5geS2U-tRNA^{Lys}, nm5geS2U-tRNA^{Lys}, geS2U-tRNA^{Lys}, mnm5geS2U-tRNA^{Glu}, nm5geS2U-tRNA^{Glu} i cmnm5geS2U-tRNA^{Gln}.

Wykorzystując modele ASL homologiczne do sekwencji tRNA^{Lys}, zawierające odpowiednio modyfikację S2U, geS2U lub Se2U stwierdzono, że SelU wykazuje bardzo wysoką specyficzność substratową w reakcji geranylowania. Pozycja S2U w łańcuchu RNA, sekwencje okalające modyfikację S2U oraz długość łańcucha RNA mają kluczowy wpływ na rozpoznawanie substratu RNA przez enzym SelU. Przesunięcie modyfikacji S2U w łańcuchu RNA z pozycji 34 do innych pozycji w pętli antykodonu (33, 35 lub 36), zamiana nukleozydu w pozycji 35, skrócenie 17-nt substratu RNA do 7-nt, czy do 3-nt prowadziły do znacznego spadku wydajności enzymu SelU. Wykazano, że pojedynczy nukleozyd (S2U, geS2U) nie jest substratem dla SelU.

Patrycja Szczupak „Aktywność białka SelU w syntezie modyfikowanych nukleozydów w transferowych RNA”

Potwierdzono, że spośród kilku dostępnych w komórkach związków prenylowych jedynie GePP (C_{10}) jest substratem dla SelU, podczas gdy pirofosforany innych prenyli, takie jak IPP (C_5), DmaPP (C_5), FPP (C_{15}) i GeGePP (C_{20}) nie są rozpoznawane przez SelU jako substraty. Badania powinowactwa SelU do pirofosforanów prenyli przeprowadzone metodą MST potwierdziły, że syntaza SelU wiąże jedynie GePP ($K_d \sim 4,7 \mu\text{M}$). Pozostałe testowane pirofosforany prenyli nie wiązały się do SelU lub ich oddziaływanie z białkiem było bardzo słabe ($K_d > 1 \text{ mM}$). Przeprowadzona analiza *in silico* potwierdziła, że spośród wszystkich badanych pirofosforanów prenyli GePP jest najlepiej wiążącym się substratem dla SelU. Co ciekawe, wszystkie otrzymane chemicznie prenylowane pochodne S2U-RNA (C_1 , C_5 , C_{10} i C_{15}) ulegały reakcji selenowania katalizowanej za pomocą SelU, chociaż produkt Se2U-RNA tworzył się z różną wydajnością w zależności od typu prenylowanego substratu (geranyl \geq farnezył $>$ dimetyloallil \gg metyl). Otrzymane wyniki sugerują, że SelU ma wysoką specyficzność substratową w reakcji prenylowania, podczas gdy dyskryminacja substratu w reakcji selenowania jest niewielka.

Co najważniejsze potwierdzono aktywność białka MBP-SelU w reakcjach geranylowania i selenowania pełniej długości naturalnych R5S2U-tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} i tRNA^{Gln} (wyizolowanych z bakterii pozbawionych genu *selU*). Transformacja natywnego bakteryjnego R5S2U-tRNA do R5Se2U-tRNA jest dwuetapowym procesem z utworzeniem R5geS2U-tRNA jako związku pośredniego. Wykazano także, że reakcja bezpośredniego selenowania R5S2U-tRNA do R5Se2U-tRNA nie zachodzi.

Otrzymane dane kinetyczne i wyznaczone stałe powinowactwa SelU do badanych ASL-RNA potwierdzają mechanizm transformacji S2U \rightarrow Se2U w bakteryjnym tRNA. SelU wiąże substrat R5S2U-tRNA i katalizuje jego geranylowanie do R5geS2U-tRNA. Geranylowany produkt pośredni pozostaje związany z enzymem do momentu pojawienia się w środowisku reakcji anionu selenofosforanowego (SePO_3^{3-}). Wówczas R5geS2U-tRNA ulega reakcji selenowania do R5Se2U-tRNA, który opuszcza enzym i bierze udział w procesie translacji.