

Recenzja Pracy doktorskiej mgr Patrycji Szczupak pt. „Aktywność białka SelU w syntezie modyfikowanych nukleozydów w transferowych RNA”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Szczupak pt. „Aktywność białka SelU w syntezie modyfikowanych nukleozydów w transferowych RNA” została wykonana w Dziale Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Nawrot (promotor rozprawy) i dr inż. Małgorzaty Sierant (promotor pomocniczy). Wyniki badań wchodzących w skład rozprawy były uzyskane w ramach dwóch projektów OPUS finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz projektu dla Młodych Naukowców CBMM, PAN. Przedmiotem rozprawy jest charakterystyka aktywności syntazy 2-selenourydyno-tRNA (SelU) oraz wyjaśnienie molekularnych podstaw reakcji transformacji 2-tiourydyny do 2-selenourydyny w bakteryjnych tRNA.

Tematyka modyfikowanych nukleozydów w transferowych kwasach nukleinowych jest od wielu lat z powodzeniem uprawiana w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Barbarę Nawrot w Zespole Terapeutycznych Kwasów Nukleinowych, Dział Chemii Bioorganicznej, CBMM, PAN w Łodzi. W ostatnich latach istotnym odkryciem zespołu było zaproponowanie molekularnego mechanizmu biosyntezy selenowanych transferowych RNA zidentyfikowanych w systemie bakteryjnym (Sierant et al. FEBS Lett 2018). Przedstawiona do recenzji dysertacja Pani mgr Patrycji Szczupak jest kontynuacją tych badań. Nukleozydy występujące w naturalnych kwasach rybonukleinowych (RNA) ulegają posttranskrypcyjnym modyfikacjom w reakcjach katalizowanych przez specyficzne enzymy. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 150 naturalnie występujących modyfikowanych nukleozydów i około 100 enzymów wprowadzających te modyfikacje (<https://doi.org/10.1093/nar/gkz011>). Spośród wszystkich znanych modyfikacji nukleozydowych większość występuje w transferowych RNA (tRNA). Modyfikowane nukleozydy uczestniczą w stabilizacji struktury przestrzennej tRNA. Mają także pierwszorzędne znaczenie w regulacji ekspresji genów poprzez poszerzanie lub zmianę właściwości dekodujących tRNA i modulują dynamikę syntezy nowych białek. Modyfikowane nukleozydy występujące w pozycji wahadłowej pętli antykodonu tRNA (pozycja 34 w łańcuchu tRNA) podwyższają możliwości tRNA do czytania kodonów synonimicznych, tzn. różniących się nukleozydem w trzeciej pozycji kodonu, np. 5'-NNA-3' i 5'-NNG-3'. Dostosowanie tempa wprowadzania modyfikacji w tRNA i czytania kodonów w mRNA pozwala komórce szybko reagować na zmiany środowiskowe, w tym odpowiadać na różnego rodzaju stesy poprzez syntezę najbardziej potrzebnych w danej sytuacji białek. Istotną grupę nukleozydów w pozycji wahadłowej tRNA stanowią nukleozydy pirymidynowe zawierające atom siarki w pozycji 2 oraz podstawnik alkilowy w pozycji 5 pierścienia uracylu (R5S2U). 5-podstawione 2-tiourydyny występują w tRNA większości organizmów, jednak do tej pory tylko w bakteriach zidentyfikowano ich selenowe- (R5Se2U) analogi i 5-geranylowane (R5geS2U) pochodne. Nukleozydy te występują w pierwszej pozycji antykodonu tRNA specyficznego dla kwasu glutaminowego, glutaminy i lizyny, rozpoznających kodony 5'-NNA-3' i 5'-NNG-3'. Wyjaśnienie

mechanizmu reakcji syntezy modyfikowanych nukleozydów, które katalizuje syntaza 2-selenourydyno-tRNA (SelU) oraz charakterystyka właściwości i wymagań substratowych tego enzymu w znaczący sposób poszerzają naszą wiedzę w dziedzinie epitranskryptomiki.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 155 stron maszynopisu, w tym 80 rycin i 44 tabele. Praca jest zbudowana w sposób klasyczny, charakterystyczny dla rozpraw doktorskich i obejmuje Streszczenie w języku polskim oraz Streszczenie w języku angielskim, Wstęp literaturowy przedstawiający aktualny stan wiedzy związanej z tematyką rozprawy (34 strony), szczegółowy opis Celu pracy doktorskiej, Wyniki badań własnych (58 stron), Dyskusję otrzymanych wyników (6 stron), Wnioski końcowe oraz Materiały i metody (24 strony). Uzupełnieniem opisu jest Bibliografia licząca 199 pozycji, Wykaz stosowanych skrótów oraz 4 Załączniki, w których umieszczono uzupełniające dane i ryciny. Zarówno kompozycja pracy jak i zawartość poszczególnych części są prawidłowe a dobrze przygotowany Spis treści ułatwia lekturę pracy.

Wstęp literaturowy został podzielony na 8 podrozdziałów, w których Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała obecny stan wiedzy na temat cząsteczek tRNA, począwszy od ogólnego omówienia budowy i charakterystycznej struktury tRNA, poprzez jego biogenezę w komórkach, od transkrypcji pre-tRNA poprzez dojrzewanie, aminoacylowanie, edycję i degradację tRNA. W kolejnym podrozdziale Doktorantka omówiła kanoniczne i niekanoniczne funkcje tRNA a następnie modyfikacje nukleozydowe występujące w tRNA, ze szczególnym uwzględnieniem tio-, S-geranylo- i selenonukleozydów występujących w pozycji wahadłowej antykodonu bakteryjnych tRNA. Omówiono ich biogenezę oraz funkcje jakie pełnią w rozpoznaniu i odczycie synonimicznych kodonów 5'-NNA-3' i 5'-NNG-3'. W kolejnych podrozdziałach wstępu literaturowego Doktorantka omówiła modyfikowane nukleozydy w rybosomalnym RNA, następnie opisała bieżący stan wiedzy na temat enzymu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej: syntazy 2-selenourydyno-tRNA (SelU). Ostatnie podrozdziały wstępu literaturowego zostały poświęcone omówieniu zależności pomiędzy występowaniem określonych chorób u ludzi a nieprawidłowościami występowania modyfikacji nukleozydowych w tRNA oraz aktualnym kierunkom rozwoju badań nad modyfikacjami tRNA występującymi w mikrobiomie jelitowym a warunkami środowiskowymi w organizmie gospodarza. Opracowana treść wstępu literaturowego recenzowanej rozprawy doktorskiej świadczy o właściwym zaznajomieniu się z tą tematyką przez Doktorantkę i dobrze wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy dotyczącej biologii tRNA. Na szczególną uwagę zasługują przygotowane przez Doktorantkę ryciny, które w znacznym stopniu ułatwiają zrozumienie rozważanego tematu.

W kolejnej części dysertacji znajduje się sformułowany przez Doktorantkę Cel pracy, którym była charakterystyka aktywności syntazy 2-selenourydyno-tRNA (SelU), bakteryjnego enzymu zaangażowanego w syntezę 5-podstawionych S-geranylo-2-tiourydyn i 5-podstawionych 2-selenourydyn występujących w pozycji wahadłowej antykodonu transferowych RNA specyficznych dla lizyny, kwasu glutaminowego i glutaminy.

Cel pracy został podzielony na 6 celów szczegółowych:

- Otrzymanie aktywnego białka SelU metodami inżynierii genetycznej,
- Identyfikacja cząsteczek tRNA związanych z białkiem SelU,
- Badanie przebiegu reakcji geranylowania S2U-RNA→geS2U-RNA i reakcji selenowania geS2U-RNA→Se2U-RNA na modelowych ASL-RNA

- Badanie specyficzności substratowej białka SelU oraz powinowactwa białka do modelowych ASL-RNA i dostępnych pirofosforanów prenyli,
- Badanie struktury przestrzennej białka SelU metodami krystalografii rentgenostrukturalnej oraz mikroskopii krioelektronowej Cryo-TEM,
- Weryfikacja hipotezy badawczej liniowego przebiegu transformacji R5S2U-tRNA → R5Se2U-tRNA z utworzeniem związku pośredniego R5geS2U-tRNA w bakteryjnych tRNA.

Realizację poszczególnych celów szczegółowych pracy doktorskiej Doktorantka opisała bardzo dokładnie i przejrzyście w kolejnym rozdziale Wyniki badań własnych. W badaniach własnych Doktorantka stanęła na początku przed zadaniem otrzymania aktywnego i stabilnego rekombinowanego białka SelU, które w dalszych etapach pracy posłużyło jako narzędzie do badań. Do tego celu Doktorantka wykorzystała bakteryjny system ekspresyjny: wektor pMAL-c5X kodujący oryginalnie gen białka wiążącego maltozę (MBP), do którego wprowadziła metodą inżynierii genetycznej gen białka SelU. Nadekspresja genu fuzyjnego *mbp-selU* w bakteriach *E. coli*, doprowadziła do uzyskania aktywnego i stabilnego białka SelU w postaci fuzyjnej z metką MBP przyłączoną do N-końca białka SelU (MBP-SelU). W przypadku rekombinowanych białek fuzyjnych częstą praktyką jest odcinanie metki za pomocą specyficznych proteaz i usuwanie jej z preparatu w celu uzyskania czystego właściwego białka. Jednak w przypadku białka MBP-SelU zauważono, że metka MBP działa stabilizująco na białko SelU powodując znaczny wzrost jego aktywności, dlatego ostatecznie metka MBP nie została odcięta i we wszystkich badaniach Doktorantka stosowała białko fuzyjne. Przedstawione w pracy wyniki aktywności białka dokumentują wiarygodność tej tezy. Otrzymane białko fuzyjne MBP-SelU charakteryzowało się bardzo dobrą wydajnością katalizy reakcji (>90% w reakcji geranylowania S2U-ASL-RNA oraz ilościową wydajnością w reakcji selenowania geS2U-ASL-RNA) oraz wysoką stabilnością. Białko fuzyjne MBP-SelU wykazywało stosunkowo wysoką odporność na degradację i utratę aktywności podczas kilkudniowej inkubacji w temperaturze 4°C i 37°C. Wysoka aktywność i stabilność białka fuzyjnego pozwoliła scharakteryzować jego właściwości i wymagania substratowe oraz uzyskać ostateczne dowody potwierdzające postulowany mechanizm działania SelU w bakteryjnych tRNA.

W kolejnym etapie pracy doświadczalnej Doktorantka ustaliła optymalne warunki przeprowadzanych reakcji (skład buforu, temperaturę i czas reakcji) oraz zoptymalizowała system analizy produktów reakcji, którym była analiza chromatograficzna RP-HPLC oraz analiza masowa produktów reakcji, która potwierdziła ich prawidłową masę. Każdy etap analizy produktów reakcji jest skrupulatnie udokumentowany poprzez umieszczenie w pracy odpowiednich chromatogramów HPLC i widm masowych. Doktorantka, charakteryzując reakcje katalizowane przez enzym SelU, wyznaczyła także stałe kinetyczne dla reakcji geranylowania i selenowania i potwierdziła znacznie podwyższoną aktywność MBP-SelU w reakcji geranylowania (1000-krotnie) i w reakcji selenowania (50-krotnie) w porównaniu do aktywności białka z metką His6. Czy Doktorantka ma pogląd, dlaczego białko z metką MBP jest tak aktywne? Proszę o wyrażenie swojej opinii w trakcie dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej.

Kolejnym ważnym etapem charakterystyki właściwości białka SelU były badania specyficzności substratowej przeprowadzone na modelowych oligorybonukleotydach ASL naśladujących strukturę pętli i trzonu antykodonu naturalnego tRNA^{Lys}, zawierających jednostkę S2U w różnych pozycjach pętli antykodonu. Doktorantka udowodniła, że enzym SelU rozpoznaje pozycję, w której naturalnie występuje 2-tiouracydina, sekwencje okalające modyfikację S2U oraz długość

oligonukleotydowego substratu RNA. Brak podstawnika mnm- (metyloaminometylo-) lub nm- (aminometylo-) na atomie węgla C5 w substratach z S2U i geS2U oraz brak innych modyfikowanych nukleozydów, które występują w pętli antykodonu naturalnego tRNA^{Lys} nie miały wpływu na aktywność katalityczną białka SelU. Ciekawa obserwacja dotyczyła wpływu nukleozydu w pozycji 35 antykodonu tRNA^{Lys} na aktywność białka SelU. Zamiana naturalnie występującej w tej pozycji reszty urydyny na resztę cytydyny lub reszty purynowe A lub G znacząco wpływała na wydajność reakcji katalizowanej przez SelU (od 10-krotnego spadku aktywności dla C po całkowite zahamowanie aktywności enzymu dla A i G).

Doktorantka przeanalizowała specyficzność enzymu w stosunku do drugiego substratu reakcji prenylowania jakim jest pirofosforan odpowiedniego prenylu. W tym celu przeprowadziła reakcje, w których zastosowała pirofosforan dimetyloallilu (DmaPP), pirofosforan izopentenylu (IPP), pirofosforan farnezyli (FPP) lub pirofosforan geranylogeranyli (GeGePP) w porównaniu z klasycznym substratem w reakcji geranylowania jakim jest pirofosforan geranyli (GePP). Doktorantka potwierdziła, że żaden pirofosforan prenyli (o krótszym lub dłuższym łańcuchu prenylowym), oprócz GePP, nie był substratem dla białka SelU, tzn. w żadnej z przeprowadzonych reakcji nie zaobserwowała powstania produktu S-prenylo-S2U-RNA. Otrzymane wyniki zostały potwierdzone również inną metodą, techniką mikroskalowej termoforezy (MST), dzięki której Doktorantka zbadała powinowactwo wiązania każdego z badanych pirofosforanów prenyli z białkiem MBP-SelU i udowodniła występowanie wiązania z białkiem SelU jedynie dla pirofosforanu GePP. Pozostałe pirofosforany prenyli nie wykazywały powinowactwa w stosunku do badanego białka. Co ważne, tym samym sprostowała hipotezę przedstawioną wcześniej przez zespół amerykański kierowany przez Jia Sheng'a, że kryterium preferowanego wyboru reszty prenylowej (w tym przypadku geranylowej) jest wyższa trwałość dupleksów RNA z parą geS2U-G w porównaniu do trwałości dupleksów RNA z parą geS2U-A. Czy Doktorantka mogłaby przybliżyć na czym dokładnie polegało obalenie hipotezy Sheng'a?

Doktorantka zaobserwowała również, że druga reakcja charakterystyczna dla enzymu SelU, reakcja selenowania przebiega znacznie szybciej niż reakcja geranylowania/prenylowania co sugeruje, że mechanizmy obu reakcji są różne. Doktorantka udowodniła, że wszystkie modele ASL-RNA, w których modyfikacja geS2U występowała w pozycjach odpowiadającym pozycjom 33, 34 lub 35 tRNA^{Lys} zostały przekształcone ilościowo do Se2U. Podobnie, chemicznie zsyntezowane S-prenylo-S2U-RNA (mS2U-RNA, dmaS2U-RNA, geS2U-RNA, fS2U-RNA) zostały przekształcone w Se2U-RNA.

Ponieważ struktura przestrzenna białka SelU nie została do tej chwili wyjaśniona (oprócz otrzymania struktur teoretycznych metodami modelowania molekularnego), Doktorantka podjęła próbę rozwiązywania struktury SelU metodą krystalizacji lub mikroskopii krioelektronowej Cryo-TEM. Niestety wszystkie podjęte próby rozwiązania struktury SelU zakończyły się niepowodzeniem. Tym niemniej, działania te należy ocenić pozytywnie w kontekście faktu, że Doktorantka poszerzyła zakres poznanych nowych metod badawczych, zwłaszcza metody Cryo-TEM.

Doktorantka potwierdziła opisane w literaturze obserwacje, że białko SelU jest nukleoproteiną zawierającą ściśle związaną frakcję tRNA, dlatego widmo absorpcji UV-VIS otrzymane dla białka wykazuje maksimum przy długości fali $\lambda=260$ nm, charakterystyczne dla kwasów nukleinowych, a nie pasmo o maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=280$ nm charakterystycznym dla białek. Po wyizolowaniu z oczyszczonego białka związanej z nim frakcji tRNA oceniono, że białko MBP-SelU wiąże tRNA w stosunku molowym 1:1, czyli jedna cząsteczka białka wiąże jedną cząsteczkę

tRNA. Stosując technikę zaawansowanej spektrometrii mas UPLC-PDA-ESI(-)-MS zidentyfikowano pełnej długości tRNA, który był związany z białkiem SelU. Wykazano, że białko SelU wiąże jedynie geranylowane frakcje tRNA: m. in. mnm5geS2U-tRNA^{Lys}, nm5geS2U-tRNA^{Lys}, geS2U-tRNA^{Lys}, mnm5geS2U-tRNA^{Glu}, nm5geS2U-tRNA^{Glu} i cmnm5geS2U-tRNA^{Gln}. Identyfikacja za pomocą spektrometrii mas pełnej długości tRNA i potwierdzenie z dużą dokładnością masy danego tRNA (powyżej 24 kDa) jest w mojej opinii znacznym osiągnięciem, opisanym po raz pierwszy w literaturze naukowej. Wynik ten potwierdzono również na poziomie analizy mieszaniny nukleozydów otrzymanych na drodze hydrolizy nukleolitycznej tRNA wyizolowanego z białka. W otrzymanej mieszaninie zidentyfikowano jedynie geranylowane nukleozydy: mnm5geS2U, geS2U, cmnm5geS2U i nm5geS2U oraz nieznaczne ilości pochodnych urydyny: mnm5U, cmnm5U i nm5U. Nie zidentyfikowano natomiast siarkowych i selenowych pochodnych urydyny. Otrzymane wyniki prowadzą jednoznacznie do wniosku, że białko SelU wiąże bardzo ściśle geranylowane pochodne tRNA. Mam tutaj pytanie, czy Doktorantce udało się otrzymać białko w formie apo, tzn. bez frakcji nukleinowej? Czy takie białko jest trwałe, aktywne?

Ostatecznie Doktorantka przeprowadziła reakcje geranylowania i selenowania naturalnych R5S2U-pochodnych tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} i tRNA^{Gln}, które zostały wyizolowane z bakterii *E. coli* z delecją genu *selU* (czyli nie posiadały zdolności wewnątrzkomórkowego geranylowania i selenowania R5S2U-tRNA). Doktorantka ostatecznie udowodniła, że SelU katalizuje transformację natywnego bakteryjnego R5S2U-tRNA do R5Se2U-tRNA, która jest dwuetapowym procesem z utworzeniem R5geS2U-tRNA jako związku pośredniego, który jest ściśle związany z białkiem SelU i prawdopodobnie nie bierze udziału w procesie translacji. Tym samym, udowodniono również, że postulowana dotychczas w literaturze reakcja bezpośredniego selenowania R5S2U-tRNA do R5Se2U-tRNA nie zachodzi.

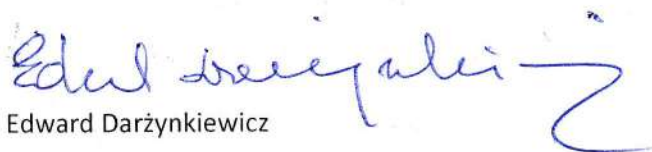
Podsumowując opisane w rozprawie doktorskiej wyniki badań własnych, stwierdzam, że zostały one otrzymane w wyniku przeprowadzenia bardzo bogatych eksperymentalnie badań, zostały klarownie i zwięźle opisane. Co więcej, otrzymane wyniki są bardzo dobrze udokumentowane pod względem spektralnym, chromatograficznym i elektroforetycznym i prowadzą do wiarygodnych wniosków. Doktorantka zrealizowała wszystkie zakładane wcześniej cele pracy doktorskiej, w odpowiedni sposób scharakteryzowała białko syntazę 2-selenourydyno-tRNA oraz udowodniła zakładaną hipotezę dotyczącą wewnątrzkomórkowego przebiegu reakcji katalizowanych przez SelU.

Część eksperymentalna zawierająca opisy zastosowanych w pracy materiałów i metod została opracowana starannie i przejrzyście. Doktorantka na 24 stronach opisuje metody stosowane w pracy. Opisy te są bardzo wyczerpujące i szczegółowe, w pełni wystarczające do powtórzenia przeprowadzonych doświadczeń. Przedstawione są również sekwencje wszystkich używanych konstruktów i skład wszystkich buforów. Opisy metod są w zasadzie zebranymi protokołami laboratoryjnymi, które mogą w przyszłości posłużyć do przeprowadzenia podobnych eksperymentów.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Szczupak, pragnę stwierdzić, że opisane przez Doktorantkę badania dotyczące ciekawych i aktualnych zagadnień naukowych, zostały wykonane z wykorzystaniem nowoczesnych i dobrze dobranych metod, które pozwoliły na uzyskanie wartościowych i ważnych poznawczo wyników. Uważam, że Pani mgr Patrycja Szczupak zrealizowała założone cele badawcze i stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie wymogi rozprawy doktorskiej.

Wyniki jej badań zostały włączone do trzech publikacji w czasopiśmie z listy JCR, dwóch komunikatów pokonferencyjnych, oraz jednego artykułu przeglądowego opublikowanego w wydawnictwie książkowym Springer, co świadczy o umiejętności profesjonalnego prowadzenia badań naukowych i potwierdza jej osobiste zaangażowanie w te badania.

Na podstawie wyżej omówionych osiągnięć stwierdzam, że przedstawiony do oceny materiał spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Patrycji Szczupak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie proponuję wyróżnienie rozprawy ze względu na bardzo szeroki zakres i wysoką jakość wykonanych badań, dogłębną charakterystykę specyficzności substratowej białka SelU, innowacyjne wykorzystanie zaawansowanych technik spektrometrii mas do przeprowadzenia badań na natywnych cząsteczkach tRNA oraz uzyskanie wyników weryfikujących błędne dane literaturowe (jak np. specyficzność substratową tytułowego białka w stosunku do substratu prenylowego, czy też potwierdzenie mechanizmu transformacji tiourydyn do selenourydyn na poziomie natywnego tRNA).



Edward Darżynkiewicz