



Zofia Szweykowska-Kulińska, prof. dr hab.
Zakład Ekspresji Genów

17.05.2023, Poznań

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Katarzyny Szczupak (z d. Komar)
zatytułowanej „Aktywność białka SelU w syntezie modyfikowanych nukleozydów w
transferowych RNA”**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana w Pracowni Terapeutycznych Kwasów Nukleinowych w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Promotorem pracy jest Pani prof. dr hab. Barbara Nawrot, a promotorem pomocniczym – Pani dr inż. Małgorzata Sierant. Częsteczki tRNA są najbardziej modyfikowanymi cząsteczkami RNA wszystkich typów komórek we wszystkich, czyli trzech domenach Życia. Grupa Pani prof. Barbary Nawrot od wielu lat jest zainteresowana syntezą modyfikowanych nukleozydów, ich wprowadzaniem do syntetycznych oligorybonukleotydów i ich rolą w stabilizacji i działaniu cząsteczek RNA. Przedstawiona praca doktorska mieści się w zainteresowaniach grupy badawczej Pani Profesor. Praca doktorska dotyczy charakterystyki, i to pod wieloma aspektami, enzymu izolowanego z *Escherichia coli* - syntazy 2-selenourydyno-tRNA (SelU). Motywem przewodnim jednak jest reakcja modyfikacji tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} i tRNA^{Gln} w pierwszej pozycji antykodonu (34), gdzie w pierwotnym transkrypcie występuje urydyna. Analizując postawiony w pracy doktorskiej cel badawczy uważam, że Kandydatka w pełni zrealizowała swój cel i scharakteryzowała biochemicznie i biofizycznie SelU – enzym zaangażowany w syntezę pochodnych/analogów hipermodyfikowanych 5-podstawionych 2-tiourydyn (w tym przypadku 5-podstawionych S-geranylo-2-tiourydyn i 5-podstawionych 2-selenourydyn) występujących w pozycji wahadłowej antykodonu wymienionych wyżej cząsteczek tRNA.

Pierwszym etapem pracy była optymalizacja procedury izolacji całego białka SelU w dużych ilościach., a także dwóch domen tego białka – domeny rodanezowej (Rho) i domeny pętli P (P-loop). Białko SelU okazało się być niestabilne i tylko ekspresja tego białka w fuzji z domeną MBP pozwalała na otrzymanie we frakcji rozpuszczalnej, satysfakcjonujących ilości białka. Pomimo dwustopniowych oczyszczeń białka (chromatografia powinowactwa na złożu amylozowym i sączenie molekularne na Superdex 200) preparatom towarzyszyła wolna domena MBP, która w spontaniczny sposób uwalniała się z fuzyjnego białka. Co prawda Kandydatka dwójako próbuje tłumaczyć obecność MBP w preparatach – również regulacją ekspresji genów *E.coli*, co jest dla mnie niezrozumiałe, ale także spontaniczną hydrolizą uwalniającą MBP, a dla mnie ta druga opcja wydaje się być słuszna. Myślę tak, gdyż stosując oczyszczone już preparaty fuzyjnego białka w kolejnych doświadczeniach widać pojawianie się samej domeny MBP, stąd tylko w ten sposób można wyjaśnić jej obecność.

Niemniej jednak po wielu podejściach doświadczalnych Kandydatka uzyskała satysfakcjonujące ilości białka MBP-SelU, białka MBP-SelU-His6 jak i pojedynczych domen MBP-Rho i MBP-P-loop. Stosując spektrometrię mas wyznaczyła masę cząsteczkową MBP-



SelU i zsekwencjonowała metodą LC-MS potwierdzając sekwencję aminokwasową większości uwolnionych z białka trypsyną peptydów.

Kandydatka podjęła trud krystalizacji MBP-SelU jednak nie udało się uzyskać kryształów całego białka. Stosując cryo-TEM uzyskała zdjęcia obiektów sugerujących obecność MBP-SelU, MBP-SelU-tRNA i MBP. Te doświadczenia zakończyły się na tym etapie gdyż by rozwiązać strukturę potrzebne byłoby przejście na wysokorozdzielczy mikroskop elektronowy, przykładowo ten będący w MCB UJ w Krakowie. Należy mieć nadzieję, że doświadczenia te będą kontynuowane i zakończą się rozwiązaniem struktury tego białka.

Kandydatka zoptymalizowała warunki prowadzenia reakcji geranylacji i selenowania ramienia antykodonowego (ASL), pod kątem stężenia jonów magnezu, czasu i temperatury dla białka SelU przyłączonego do różnego typu etykiet i wykazała, mierząc aktywność ilością geranylowanego produktu, że warianty białka SelU z etykietami o większej masie cząsteczkowej są bardziej aktywne katalitycznie.

Stosując ten sam modelowy substrat oligonukleotydowy, tyle że zmodyfikowany przy atomie 5 uracylu - mnm5S2U(34)-tRNA^{Lys} wykazała, że podstawnik R5 nie ma wpływu na wydajność analizowanej reakcji geranylacji, a następnie selenowania. Ciekawym byłoby jednak wiedzieć, czy w takim razie obecność geranylo-S2U(34) RNA lub Se2U(34)-RNA jest wymagana do modyfikacji na atomie 5-tym uracylu?

W dalszej części pracy wykazała, że żadna z wyizolowanych domen z osobna, jak i dodanych razem, nie katalizuje reakcji geranylacji i selenowania modelowego substratu. To ciekawy wynik w kontekście tego co pisze Autorka, że przynajmniej u jednego z archeonów obie domeny są kodowane przez niezależne geny.

Autorka wyznaczyła stałe kinetyczne dla reakcji geranylacji i selenowania dla MBP-SelU. Porównując uzyskane wartości dla MBP-SelU i SelU-His6 wykazała, że ten pierwszy wariant jest 1000 bardziej efektywny w reakcji geranylacji, a w reakcji selenowania – 50 razy bardziej efektywny. Zatem zasadnym było pracować z wariantem SelU w fuzji z MBP. Stabilność i aktywność katalityczna białka MBP-SelU była wysoka w temperaturze 4°C, natomiast w temperaturze 37°C dochodziło do szybkiej degradacji i utraty aktywności katalitycznej (po 24 godzinach)

W dalszej części doktoratu Kandydatka zajęła się analizą warunków przeprowadzenia reakcji na mini-substratach, będących w maksymalnym ujęciu ramieniem antykodonowym tRNA (ASL), a w minimalnym nukleozydem S2U. Porównując wyniki modyfikowanych substratów wykazała, że najefektywniej dochodzi do geranylacji 17-nukleotydowego substratu ASL, trójnukleotydowy jest już bardzo słabym substratem, a S2U nie jest substratem w ogóle. Przesunięcie grupy tiolowej do U33 znacząco hamowało reakcję geranylacji, natomiast przesunięcie grupy tiolowej do pozycji U35 i U36 obniżało wydajność geranylacji, ale najsilniej w przypadku pozycji 36. Natomiast co ciekawe, reakcja selenowania nie jest już tak wymagająca strukturalnie i zasadniczo zachodziła z podobną wydajnością w przypadku geranylowanych urydyn w pozycjach U33/34/35/36. Ta komfortowa sytuacja 4 nukleozydów urydynowych w pętli antykodonowej występuje tylko w przypadku tRNA^{Lys}.

Przeanalizowano zatem reakcję geranylacji i selenowania dla spinek ASL o antykodonach S2UCU, S2UAU i S2GU. Tranzycja wywołała 10-krotne obniżenie wydajności geranylacji



S2U(34), a transwersje niemalże znosiły aktywność enzymu w kierunku takich substratów (około 2% aktywności ASL o sekwencji ramienia antykodonowego tRNA^{Lys}).

Podsumowując tę część pracy doktorskiej należy stwierdzić, że enzym wykazuje zależność od struktury i sekwencji nukleotydowej substratu, jak zresztą wiele innych enzymów modyfikujących RNA, a zwłaszcza tRNA. Natomiast miałabym pewną uwagę związaną ze stosowaniem substratów typu ASL. Otóż jest wiadomym, że mini-substraty typu spinka do włosów, takie jak ramię antykodonowe, mają tendencje do samoistnego tworzenia dimerów z wewnętrzną, symetryczną pętlą. Ta tendencja jest bardzo silna i należałoby przed każdym doświadczeniem „zagotować” substrat i natychmiast włożyć w lód by zminimalizować spontaniczne reakcje dimeryzacji. Czy Autorka wzięła pod uwagę możliwość, że działała na dimerycznych substratach?

Kolejnym pytaniem, na które odpowiedziała Kandydatka była kwestia specyficzności substratowej w reakcji prenylowania modelowego substratu. Jako substraty wybrano homologi izoprenylowe C5, C15 i C 20 (reszta geranylowa to C10). Okazało się, że reakcja jest bardzo specyficzna i żaden z krótszych ani dłuższych łańcuchów prenylu niż pirofosforan geranylu nie był substratem reakcji katalizowanej przez SelU. Natomiast reakcja selenowania nie jest specyficzna i wszystkie sztucznie uzyskane S-prenylo-S2U(34)-RNA były podstawiane selenem.

Najważniejsza część doktoratu opisuje przeprowadzenie reakcji na naturalnych bakteryjnych tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} i tRNA^{Gln}, które wyizolowano ze szczepu *E.coli* z unieczynnionym genem SelU stosując biotynylowane oligonukleotydy komplementarne do odpowiednich domen ASL. Wykazano, że wszystkie tRNA są substratami, które ulegają wydajnej geranylacji i selenowaniu w obecności SelU. Udowodniono również, że reakcja selenowania pełnych tRNA również wymaga stadium pośredniego jakim jest geranylacja substratu. Nie można otrzymać Se2U(34)-tRNA bez podania substratu do geranylacji odpowiedniej cząsteczki tRNA. Wynik ten potwierdziła również analiza masowa mieszaniny nukleozydów uzyskanych po hydrolizie i defosforylacji produktów reakcji geranylowania i selenowania. W kolejnym rozdziale pracy zbadano powinowactwo białka MBP-SelU do modelowych oligorybonukleotydów zawierających pojedynczą modyfikację S2U, geS2U i Se2U. Wykazano, że najsilniejsze oddziaływanie obserwuje się pomiędzy białkiem MBP-SelU i modyfikowanym grupą geranylową oligorybonukleotydem, a najsłabsze wykazuje produkt końcowy – Se2U-RNA.

Ustalono również stałe powinowactwa pirofosforanów prenyli do białka MBP-SelU i potwierdzono, że tylko pirofosforan geranylu jest substratem dla syntazy SelU.

Bardzo ciekawy jest kolejny rozdział pracy, w którym Autorka wykazuje, że w preparatach MBP-SelU znajduje się silnie związany tRNA. Stosując zaawansowane techniki bioinformatyczne i biochemiczne (LC-MS i analiza składu nukleotydowego tRNA) wykazała, że są to głównie R5geS2U-tRNA, które są selenowane po dodaniu SePO₃³⁻. Odkrycie cząsteczek tRNA w izolowanym białku SelU powoduje, że mam jeszcze pytania dotyczące prowadzonych badań nad specyficznością oddziaływań, badaniami aktywności enzymu przy podaniu egzogennych substratów. Na ile obecność endogennych, bakteryjnych tRNA związanych z SelU mogła wpłynąć na przedstawione wcześniej wyniki badań?



Na koniec chciałabym postawić jeszcze dwa pytania: zastanawia mnie dwustopniowość reakcji modyfikacji pozycji wahadłowej, w której potrzebna jest jako etap pośredni geranylacja U34. Myśląc o powstawaniu selenocysteiny z seryny na tRNA^{Sec}, która nie wymaga geranylacji zastanawiam się nad opisanym mechanizmem i przyczynami takiego rozwiązania biologicznego. Ponadto chciałabym zapytać czy wiadomo jaką rolę pełni Se2U(34) w tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} i tRNA^{Gln}?

Praca jest napisana ładnym językiem, logicznie i czyta się ją stosunkowo łatwo. Jej mankamentem jest jednak nadmierne powtarzanie się w poszczególnych rozdziałach, zwłaszcza gdy chodzi o sekcję Materiały i Metody i sekcję Wyniki. W mojej opinii w sekcji wyniki opisanie stosowanych procedur jest stanowczo zbyt szczegółowe i powinno być ograniczone w wielu miejscach do sekcji Materiałów i Metod. Również wstęp do pracy nie jest tak naprawdę przeglądem literatury przedmiotu pracy doktorskiej, a niemalże podręcznikowym opisem wszystkiego co wiemy na temat tRNA. Przykładowo, po co we wstępie umieszczono rozdział pod tytułem „Modyfikowane nukleozydy tRNA w chorobach ludzkich”? Po co omawiane są modyfikowane nukleozydy w rybosomowym RNA? Już bardziej przydatne byłoby wprowadzenie w techniki, których używała Doktorantka w trakcie realizacji swojej pracy i ich znaczenia w identyfikacji modyfikowanych nukleozydów. Te uwagi jak i uwagi/pytania zadane w recenzji nie obniżają mojej wysokiej oceny tej pracy doktorskiej. Doktorantka opanowała metodykę ekspresji, izolacji białek, techniki identyfikacji białek, techniki związane z identyfikacją modyfikowanych nukleozydów, wreszcie dostarczyła ważnych dla nauki danych charakteryzujących aktywność syntazy 2-selenourydyno-tRNA, wymogów strukturalnych substratu dla tego enzymu i udowodniła dwustopniowość reakcji selenowania U34 w badanych tRNA. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały już opublikowane w trzech pracach naukowych w *Bioorganic Chemistry*, *Cells* i jako rozdział w seryjnej książce wydawanej przez Springer Nature Handbook, a także podczas licznych konferencji naukowych.

Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych o dopuszczenie mgr Patrycji Katarzyny Szczupak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto z uwagi na znaczące wyniki rozprawy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie mgr Patrycji Szczupak stosowną nagrodą.

Zofia Szweykowska-Kulińska