

Dr hab. Agata Starosta
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
agata.starosta@ibb.waw.pl
tel. 22 592 3341

Warszawa, 05.09.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej Mikołaja Sokołowskiego

Rozprawa doktorska zatytułowana „Triggers of the thiolation cascade – biochemical and structural analysis of sulfur transfer in the tRNA modification pathway” została przygotowana przez Pana Mikołaja Sokołowskiego pod opieką promotorską dr hab. Sebastiana Glatta. Praca została przedłożona Radzie Dyscypliny Nauk biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Głównym celem pracy badawczej przedstawionej w niniejszej dysertacji jest charakterystyka strukturalna i funkcjonalna enzymów kaskady tiolacyjnej – Uba4, Urm1 oraz kompleksu Ncs2/Ncs6, prowadzących do powstania modyfikacji, tiolanu urydyny U34 transferowego RNA (tRNA). Wyniki przedstawione w pracy są nowe, wcześniej niepublikowane i stanowią uzupełnienie badań dotychczas publikowanych przez grupę.

Praca doktorska mgra Mikołaja Sokołowskiego została napisana w języku angielskim. Treść pracy jest zgodna z tematem wskazanym w tytule. Układ treści jest właściwy i prawidłowy dla danego formatu. Praca jest standardowo podzielona na kilka głównych rozdziałów: *Streszczenie, Wstęp, Cele Pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie*. Autor wykorzystał obszerną bibliografię odwołującą się do 138 artykułów naukowych. Autor stosuje w pracy odpowiedni dla tego formatu język i terminologię. Spis treści przygotowany jest prawidłowo. W pracy brakuje spisu skrótów oraz listy tabel i rycin. Praca jest przejrzysta, rzeczowa oraz starannie przygotowana. Tekst opatrzony jest 42-ma rycinami i 24-ma tabelami. Ryciny są starannie przygotowane, opisy na nich umieszczone są czytelne. Bibliografia została odpowiednio użyta w tekście i we właściwy sposób użyta do dyskusji wyników.

Pierwszy rozdział, *Wstęp*, autor rozpoczyna zwięzłym opisem procesu biosyntezy białka oraz przybliży rolę tRNA w tym procesie. Następnie przybliży tematykę modyfikacji tRNA, opisuje rolę modyfikacji w translacji, typy modyfikacji w zależności od ich lokalizacji i roli. Następnie, autor opisuje kaskadę tiolacyjną, jej poszczególne etapy, enzymy zaangażowane w następujące po sobie reakcje. W trzecim, ostatnim podrozdziale *Wstępu*, autor dyskutuje konsekwencje braku modyfikacji tRNA u człowieka.

Następnie, autor przedstawia szczegółowe *Cele badawcze*, których zadaniem jest charakterystyka strukturalna i funkcjonalna enzymów kaskady tiolacyjnej – Uba4, Urm1 oraz kompleksu Ncs2/Ncs6. W tym: (1) analiza strukturalna kompleksu Uba4/Urm1 przy wykorzystaniu techniki mikroskopii krio-elektronowej; (2) odtworzenie *in vitro* reakcji tiokarboksylacji przeprowadzanej przez enzym Uba4; (3) analiza roli konserwatywnych cystein Uba4; (4) ustalenie punktów kontrolnych w tiokarboksylacji dla

kompleksu Uba4/Urm1; (5) analiza form pośrednich w zależności od substancji redukującej oraz źródła siarki; (6) badanie interakcji pomiędzy Uba4/Urm1 z innymi białkami kaskady tiolacyjnej; (7) optymalizacja ekspresji białek Ncs2 oraz Ncs6 oraz próby analizy ich struktur metodami krystalizacji oraz mikroskopii krio-elektronowej.

W rozdziale *Materiały*, autor podaje listy odczynników i sprzętów wykorzystanych w eksperymentach oraz wymienia sekwencje starterów DNA użytych do przygotowania konstruktów do ekspresji białek rekombinowanych, ich mutantów, plazmidów użytych do badań, szczepów bakterii wykorzystywanych do ekspresji białek oraz buforów użytych do oczyszczania białek i przeprowadzania reakcji enzymatycznych.

W rozdziale *Metody*, autor opisuje protokoły, z których korzystał w celu realizacji zadań badawczych. Opisane jest przygotowanie konstruktów, w tym mutantów, do heterologicznej ekspresji białek kaskady tiolacyjnej, oczyszczanie białek rekombinowanych z wykorzystaniem etykietek, heparyny. Przedstawione są również krótkie protokoły dla metod wykorzystanych w analizach oligomeryczności oczyszczonego białka, interakcji białko-białko, badania struktury. A następnie są opisane warunki przeprowadzania reakcji enzymatycznych.

Sekcję *Wyniki* autor podzielił na dwie części: (1) dotyczącą Uba4/Urm1 oraz (2) Ncs2/Ncs6. Pierwszą część autor rozpoczyna od opisu danych literaturowych dotyczących analiz strukturalnych białek Uba4 i kompleksu Uba4/Urm1. Informacje te mogły być również umieszczone we *Wstępie*.

Następnie autor opisuje swoją strategię oczyszczania białek Uba4, Urm1 z *Chaetomium thermophilum* oraz tworzenia ich kompleksu. Następnie pokrótce opisuje próby analiz struktury kompleksu Uba4/Urm1 przy wykorzystaniu mikroskopii krio-elektronowej. W sposób zwięzły przedstawia proces analizy danych, rekonstrukcji 3D, problemy związane z preferowaną orientacją kompleksu na tzw. 'gridach'. A następnie, autor przedstawia przybliżony model strukturalny kompleksu Uba4/Urm1. Autorowi udało się uzyskać kompleks o przybliżonej rozdzielczości 5,66Å. Niska rozdzielczość może sugerować obecność więcej niż jednej konformacji białek/kompleksu. Z racji tego, że nie jest to wynik pozwalający na opisanie szczegółów struktury, autor podjął próbę sortowania stanów strukturalnych kompleksu Uba4/Urm1. W kolejnym podrozdziale, autor opisuje reakcje tiokarboksylacji Urm1 przez Uba4. Autor bada poszczególne etapy tej reakcji, adenylację, formację tioestrowego wiązania pomiędzy Uba4-Urm1. Autor monitoruje postępy reakcji wykorzystując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. W badaniach wykorzystywane są zarówno białka z *Ch. thermophilum* jak i z *Saccharomyces cerevisiae*. Wyniki adenylacji i tioestryfikacji są również monitorowane przy wykorzystaniu spektrometrii mas. Następnie, autor bada udział czterech cystein (C132, C202, C305, C397, numeracja *Ch. thermophilum*) zlokalizowanych w centrum katalitycznym Uba4 w tworzeniu tioestrów i w konsekwencji, zdolność do przeprowadzenia reakcji tiokarboksylacji. Autor przygotował pojedyncze, podwójne, potrójne i poczwórne mutanty z substytucją cysteiny alaniną. Wykazał, że obecność C202 i C397 jest niezbędna do przeprowadzenia tiokarboksylacji. Natomiast frakcja opisanych w pracy mutantów ma zdolność do tworzenia niekanonicznych tioestrów, przy braku możliwości przeprowadzenia reakcji tiokarboksylacji. By opisać szczegółowo mechanizm tiokarboksylacji, autor bada również wpływ egzogennej substancji redukującej i wykazuje, że nie jest on potrzebny do zakończenia reakcji. Nadmiar Uba4 jest wystarczający do pełnej tiokarboksylacji Urm1, ale Urm1 nie zostaje uwolniony z kompleksu, prawdopodobny udział disiarczku acylu w formy pośredniej, nawet w

obecności egzogenego reduktora. Następnie autor pokazuje, że obecność świeżego Urm1 jest prawdopodobnie konieczne do uwolnienia tiokarboksylowanego Urm1 oraz, że obecność DTT kompensuje reakcję tiokarboksylacji Urm1-C202 i Urm1-C397. Autor pokazuje, że Urm1-Uba4 tioester musi być chroniony *in vivo* od substancji redukujących takich jak L-cysteina.

W drugiej części *Wyników*, autor opisuje analizy kompleksu Ncs2/Ncs6. Ich zadaniem jest transfer siarki z Urm1-COSH na tRNA, prowadząc do powstania modyfikacji, tiolanu urydyny U34. Autor przedstawia optymalizację ekspresji genów Ncs2 oraz Ncs6 z *S. cerevisiae* oraz *S. pombe*, które okazują się nierozpuszczalne w bakteryjnym systemie ekspresji. Biosynteza białek *Ch. thermophilum* prowadzi do otrzymania rozpuszczalnych produktów. Następnie autor przedstawia proces oczyszczania białek. Ncs2 wydaje się być monomerem, zaś Ncs6 występuje w kilku stanach oligomerycznych. Autor potwierdził stabilne i silne oddziaływanie pomiędzy białkami Ncs2-Ncs6 wykorzystujące metody biochemiczne i biofizyczne. A następnie badał oddziaływanie Ncs2/Ncs6 z białkiem Urm1 potwierdzając wiązanie Ncs6 z Urm1. Ncs2 nie wykazało wiązania z Urm1, a autor sugeruje, na podstawie wyników, jego rolę jako białka wspierającego/stabilizującego/regulującego dla Ncs6. W kolejnych etapach badań, autor pokazuje wiązanie Ncs2, Ncs6, Ncs2/Ncs6, ale nie Uba4 i Urm4, do tRNA, co jest w zgodzie z rolą tych białek w kaskadzie modyfikacji tRNA.

W trzeciej części *Wyników*, autor opisuje modele strukturalne kompleksu Ncs2/Ncs6 wygenerowane przy pomocy algorytmu Phyre i Alphafold oraz opisuje próby krystalizacji kompleksu.

W *Dyskusji* autor rozważa powody dla których nie powiodła się analiza strukturalna kompleksu Uba4/Urm1 przy wykorzystaniu mikroskopii krio-elektronowej oraz dyskutuje próby optymalizacji kompleksu. Autor dyskutuje relacje Uba4/Urm1 ze znanymi enzymami aktywującymi ubikwitynę E1 w odniesieniu do mechanizmu działania enzymów, ich struktury. Oraz dyskutuje próby krystalizacji kompleksu Ncs2/Ncs6. Autor kończy *Dyskusję* rozważaniami na temat roli Ncs2 w kaskadzie tiolacyjnej

Podsumowując, autorowi pracy udało się opisać mechanizm reakcji enzymatycznej prowadzonej przez Uba4/Urm1. Autor zbadał rolę form pośrednich reakcji tiokarboksylacji: adenylacji, tioestryfikacji oraz disiarczanu acylu. Rekonstrukcja struktury kompleksu Uba4/Urm1, chociaż o niskiej rozdzielczości, pozwoliła na opisanie pewnych szczegółów kompleksu, zwłaszcza w odniesieniu do danych biochemicznych i biofizycznych. Autor opisał oddziaływanie Urm1 z Ncs6 oraz badał rolę Ncs2. W niniejszej pracy zaprezentowano analizy poszczególnych etapów kaskady tiolacyjnej prowadzące do powstania modyfikacji tiolanu urydyny U34 tRNA.

Komentarz merytoryczny:

- Autor wykorzystuje w badaniach geny białek pochodzące z *Chaetomium thermophilum*. Jest to organizm, dla którego optymalna temperatura wzrostu, a w konsekwencji również optymalna temperatura reakcji enzymatycznej, to 50-55°C. Jednak autor przeprowadzał reakcje w temperaturze 37°C. Niedopasowanie temperatury do reakcji może skutkować niską aktywności, co możemy zaobserwować w pracy. Jaki był powód dla którego wybrano taką temperaturę?

- Oczyszczanie białek kodowanych przez geny pochodzące z organizmów termofilnych niejednokrotnie można oczyszczać poprzez podgrzanie supernatantu. Czy autor próbował tej metody?
- Autor mógł w sposób bardziej systematyczny opisywać wyniki dla enzymów z *S. cerevisiae* oraz *Ch. thermophilum*. W pracy wyniki się przeplatają, podobnie z numeracją aminokwasów.
- Autor mógłby dodać do pracy uliniowania sekwencji aminokwasowych badanych białek wraz z zaznaczonymi cysteinami oraz elementami strukturalnymi.
- Postęp reakcji enzymatycznych monitorowany na żelach poliakrylamidowych mógł być skwantyfikowany np. przy wykorzystaniu Fiji ImageJ.
- Czy były podjęte próby oczyszczenia kwasów nukleinowych, które oczyszczały się wspólnie z kompleksem Ncs2/Ncs6?
- W tekście autor używa skrótu CAA zamiast CCA do opisu końca tRNA.
- Brakuje listy skrótów.
- Metody wykorzystane w badaniach mogłyby być opisane we wstępie.
- W materiałach brakuje szczegółowego opisu szczepów użytych w pracy (Tabela 14)
- Rozprawa zawiera nieznaczące pomyłki językowe. Nie obniżają one wartości pracy.

Niniejszą pracę oceniam *bardzo dobrze*. Autor prawidłowo planuje eksperymenty i rozwiązuje napotkane trudności. Widać ogrom pracy włożony w badania, nawet jeśli nie wszystkie zamierzone cele zostały osiągnięte. Wyniki stanowią kontynuację zagadnień badanych w laboratorium promotora i z pewnością będą opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie.

Stwierdzam, że praca doktorska Pana mgra Mikołaja Sokołowskiego spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zm.). Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pana mgra Mikołaja Sokołowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.



Dr hab. Agata Starosta