

## Streszczenie

Kti12 jest białkiem regulatorowym konserwatywnego ewolucyjnie kompleksu Elongatora, który składa się z sześciu białek (Elp1-6) i jest odpowiedzialny za modyfikację urydyny w pozycji 34 ( $U_{34}$ ) w transferowym RNA (tRNA). Podjednostka białkowa Elp3 katalizuje powstawanie 5-karboksymetylourydy ( $cm^5U$ ), będącej prekursorem 5-karbamoilometylourydy ( $ncm^5U$ ), 5-metoksykarbonylometylourydy ( $mcm^5U$ ) oraz 5-metoksykarbonylometylo-2-tiourydy ( $mcm^5s^2U$ ). Brak modyfikacji  $U_{34}$  prowadzi do nieprawidłowego fałdowania się łańcucha polipeptydowego w trakcie translacji oraz powstawania agregatów białkowych. Obniżona aktywność Elongatora została powiązana z niektórymi chorobami neurologicznymi, natomiast podwyższony poziom jego podjednostek białkowych zaobserwowano w różnych nowotworach. Kti12 reguluje aktywność Elongatora poprzez wspomaganie fosforylacji podjednostki białkowej Elp1, jednakże dokładny mechanizm tej regulacji nie został jeszcze poznany. Kti12 wykazuje duże podobieństwo strukturalne do kinazy O-fosfoserylo-tRNA (PSTK), która bierze udział w biosyntezie selenocysteiny. Oba białka składają się z dwóch domen połączonych elastycznym linkerem. Domena N-końcowa rozpoznaje ramię akceptorowe tRNA oraz wykazuje aktywność ATPazową, natomiast domena C-końcowa wiąże rdzeń tRNA. Ponadto aktywność enzymatyczna archeonowego PSTK i drożdżowego Kti12 jest indukowana przez wiązanie tRNA<sup>Sec</sup>. Dotychczasowe badania koncentrowały się głównie na *grzybiczym* Kti12. W niniejszej pracy podjęto pierwszą próbę scharakteryzowania ludzkiego Kti12 (KTI12). Oceniono fenotyp komórek HEK293T oraz BJ, w których przy użyciu shRNA wyciszono ekspresję KTI12. Obniżenie poziomu KTI12 nie wpłynęło jednak na proliferację i żywotność komórek, ani na ich migrację. Zaobserwowano natomiast, że w komórkach z obniżoną ekspresją KTI12 poziom  $mcm^5s^2U_{34}$  w tRNA<sup>Lys</sup> i tRNA<sup>Arg</sup> jest niższy w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Wykazano także, że KTI12 jest zlokalizowane głównie w cytoplazmie. Podobnie jak w przypadku drożdżowego KTI12 oraz archeonowego PSTK, aktywność ATPazowa ludzkiego KTI12 oraz PSTK jest indukowana przez tRNA<sup>Sec</sup>. Co ciekawe, wzrost aktywności PSTK jest większy gdy w tRNA<sup>Sec</sup> obecny jest dyskryminator, natomiast w przypadku KTI12 efekt ten jest odwrotny. Ponadto, w odróżnieniu od PSTK, KTI12 jest aktywowane także przez tRNA<sup>Arg</sup>. Analiza oddziaływań KTI12 z metką Myc-FLAG wykazała, że podobnie jak u drożdży, głównym partnerem KTI12 jest Elongator. Dodatkowo zidentyfikowano nowego potencjalnego partnera KTI12, MINDY-3, który jest białkiem należącym do rodziny deubikwitynaz. Stwierdzono, że obie domeny KTI12 biorą udział w oddziaływaniu z Elongatorem i MINDY-3, a aktywność ATPazowa KTI12 nie jest istotna dla tego procesu. Ponadto podjęto próbę analizy oddziaływań PSTK z metką Myc-FLAG, która wykazała, że białko to nie ma wspólnych partnerów z KTI12. Dopełnieniem badania interaktomu białkowego KTI12 było zastosowanie metody znakowania białek *in vivo*, BioID2, która pozwoliła zidentyfikować białka znajdujące się w pobliżu KTI12. Należą do nich białka związane z metabolizmem RNA oraz transportem pęcherzykowym. Podsumowując, praca ta dostarcza informacji na temat ludzkiego KTI12, a w szczególności jego oddziaływań z innymi białkami oraz zawiera analizę porównawczą ludzkiego KTI12 i PSTK. W niniejszej pracy potwierdzono, iż głównym partnerem białkowym KTI12 jest Elongator. Ponadto wykazano, iż ludzkie KTI12 oraz PSTK pełnią niezależne funkcje i mają odmiennych partnerów białkowych. Zahamowanie aktywności KTI12 nie wpływałoby więc bezpośrednio na procesy komórkowe zależne od PSTK. W szerszej perspektywie, wyniki te mogą stanowić wstęp do dalszych badań nad opracowaniem metody hamowania aktywności KTI12, która pozwoliłaby regulować aktywność Elongatora w chorobach nowotworowych.

Malopolska Centre of Biotechnology (MCB)  
Max Planck Research Group Leader

Sebastian Glatt, PhD

## Abstract

Kti12 is a regulatory protein of the highly conserved Elongator complex, which consists of six proteins (Elp1-6) and is responsible for the modification of uridines at position 34 ( $U_{34}$ ) in transfer RNA (tRNA). The Elp3 subunit catalyzes the formation of 5-carboxymethyluridine ( $cm^5U$ ), which is a precursor of 5-carbamoylmethyluridine ( $ncm^5U$ ), 5-methoxycarbonylmethyluridine ( $mcm^5U$ ) and 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine ( $mcm^5s^2U$ ). The lack of  $U_{34}$  modifications leads to incorrect folding of the nascent polypeptide chain during translation and to the formation of protein aggregates. The decreased activity of the Elongator complex has been linked to certain neurological diseases, while the increased level of Elongator subunits has been observed in various cancers. Kti12 regulates Elongator activity by promoting the phosphorylation of the Elp1 subunit. However, the precise mechanism of this process is yet to be elucidated. Kti12 is structurally very similar to O-phosphoseryl-tRNA kinase (PSTK), which is involved in the biosynthesis of selenocysteine. Both proteins consist of two domains connected by a flexible linker. The N-terminal domain recognizes the tRNA acceptor stem and harbors ATPase activity, while the C-terminal domain binds the core of the tRNA. The enzymatic activity of archaeal PSTK and yeast Kti12 is induced by binding of  $tRNA^{Sec}$ .

Previous studies have mainly focused on fungal Kti12. In this work, I aimed to characterize human Kti12 (KTI12) for the first time. HEK293T and BJ cells after a KTI12 knock-down were subjected to phenotypic analyses. Silencing of KTI12 did neither affect cell proliferation, viability, nor migration of these cell lines. However, it was observed that the level of  $mcm^5s^2U_{34}$  in  $tRNA^{Lys}$  and  $tRNA^{Arg}$  from KTI12 knock-down cells is lower when compared to control cells. Furthermore, my work shows that KTI12 is localized mainly in the cytoplasm. Similar to yeast Kti12 and archaeal PSTK, the ATPase activity of human KTI12 and PSTK is induced by  $tRNA^{Sec}$ . Interestingly, the increase of PSTK activity is more significant when a discriminator base is present in  $tRNA^{Sec}$ , while for KTI12, this effect is opposite. Unlike PSTK, KTI12 is also activated by  $tRNA^{Arg}$ . The analysis of protein interactions of Myc-FLAG-tagged KTI12 confirmed that, like in yeast, the main interaction partners of KTI12 are Elongator subunits. Additionally, a novel potential partner of KTI12 was identified, namely MINDY-3, which belongs to the family of deubiquitinating enzymes. Both KTI12 domains are involved in the interaction with Elongator and MINDY-3, and the ATPase activity of KTI12 is dispensable for this process. In addition, an attempt was made to analyze interactions of Myc-FLAG tagged PSTK, which revealed that PSTK and KTI12 do not share common binding partners. The study of the KTI12 interactome was completed using an *in vivo* protein labelling method, namely BioID2. This approach enabled the identification of proteins in the proximity of KTI12, which include proteins related to RNA metabolism and vesicular transport.

Overall, this work provides deep insights into human KTI12, particularly its protein-protein interactions, and presents a comparative analysis of human KTI12 and PSTK. In this study, it was confirmed that human Elongator is the main interaction partner of KTI12. In addition, it was revealed that human KTI12 and PSTK have independent functions and distinct sets of partner proteins. Thus, inhibition of KTI12 activity would not directly affect PSTK-dependent cellular processes. In a broader perspective, these results pave the way for further research on the development of a method of inhibiting the KTI12 activity, which would allow limiting the activity of Elongator in cancer cells.