

Streszczenie

Szlak kaskady tiolacyjnej jest zaangażowany w modyfikację cząsteczek tRNA, gdzie odpowiada za transfer siarki do urydyny (U_{34}) wybranych tRNA. Modyfikacja poprzez dodanie atomu siarki reguluje szybkość i specyficzność oddziaływań kodon-antykonon w rybosomie, w konsekwencji zapewniając poprawną translację. Brak modyfikacji U_{34} zaburza homeostazę proteomu i promuje agregację białek, ale co ważniejsze jest powiązany z ciężkimi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi u ludzi. Poszczególne enzymy i etapy kaskady tiolacyjnej są znane – w tym (i) desulfuracja L-cysteiny przez Nfs1, (ii) wychwytywanie nietrwałej grupy persulfidowej przez Tum1 oraz (iii) przeniesienie persulfidu do Uba4, który najpierw adenyluje, a następnie tiokarboksyluje C-koniec Urm1. Tiokarboksylowane Urm1 ostatecznie dostarcza siarkę do kompleksu Ncs2/6, który oddziałuje z cząsteczką tRNA tioluje pozycję U_{34} do s^2U_{34} . Jednakże, mechanizmy osiągania specyficzności transferu siarki i sposoby w jakie zaangażowane enzymy mogą uniknąć szkodliwych reakcji ubocznych, nie są znane.

Nijniejsza praca ma na celu odpowiedź na te pytania poprzez analizę strukturalną i biochemiczną centralnych enzymów kaskady tiolacyjnej mianowicie Uba4, Urm1 i kompleksu Ncs2/6. Rekonstrukcja krio-EM kompleksu Uba4/Urm1 zapewnia wgląd w końcowe etapy reakcji, w którym persulfidowana Cys397 z Uba4 jest gotowa do tiokarboksylacji Urm1. Rekonstrukcja *in vitro* tiokarboksylacji Urm1 pozwoliła na zbadanie mechanizmów regulacyjnych zaangażowanych we wszystkie etapy cyklu reakcji Uba4/Urm1, w tym: wiązanie, adenylację, tioestryfikację, tiokarboksylację oraz redukcję disiarczku acylu i uwolnienie aktywnego Urm1 z Uba4. Kompleksowa analiza mutantów białkowych ewolucyjnie zakonserwowanych cystein w Uba4 potwierdziła konieczność tioestryfikacji i tiokarboksylacji za pomocą Cys202 i Cys397, jednocześnie ujawniając reaktywność adenylowanego związku pośredniego Urm1. Ponadto tioester Urm1 został przebadany przy użyciu różnych źródeł siarki i czynników redukujących. Przeprowadzenie reakcji tiokarboksylacji kontrolowanymi etapami dało wgląd w stechiometrię kompleksu Uba4/Urm1, jednocześnie wykazując potrzebę egzogenego czynnika redukującego do wydajnego obrotu reakcji, ale nie samego wytworzenia tiokarboksylanu Urm1. Ponadto, uzyskanie rozpuszczalnych białek Ncs2 i Ncs6 umożliwiło ich biochemiczną charakterystykę. Białka tworzą heterodimeryczny kompleks Ncs2/6 o wysokim powinowactwie, co skutkuje wyższą stabilnością termiczną w porównaniu do poszczególnych podjednostek. Zarówno same białka, jak i kompleks, oddziałują z fosfonukleotydami i tRNA, podkreślając ich rolę w tiolacji.

Wykazano również specyficzność wiązania Urm1 z Ncs6, ale nie z Ncs2. Podjęto i opisano szeroko zakrojone próby krystalizacji Ncs2, Ncs6 i Ncs2/6.

Przedstawiona praca opisuje szczegółową strukturalną i mechanistyczną kontrolę transferu siarki w pojedynczym cyklu reakcji Uba4/Urm1. Ponadto, w pracy przedstawiono pierwszą biochemiczną charakterystykę kompleksu Ncs2/6 i jego związek z komponentami poprzedzającymi i następującymi w kaskadzie tiolacyjnej. Warto zauważyć, że kaskada tiolacyjna znajduje się w unikalnym ewolucyjnie punkcie, pomiędzy kaskadami prokariotycznych przekaźników siarkowych a eukariotyczną rodziną białek podobnych do ubikwityny. W tym kontekście, eksperymentalne próby zrozumienia reaktywności i regulacji siarki zapewniają wgląd w kluczowe mechanizmy komórkowe zaangażowane w izopeptydowe sprzężenie białek, reakcję na stres oksydacyjny, i zapewnienie poprawnego mechanizmu translacji.