

## Streszczenie

Stres oksydacyjny może prowadzić do przeprogramowania modyfikacji tRNA, co ma falowy wpływ na kluczową dla przetrwania komórek syntezę białek. Aby zoptymalizować proces translacji białek, niezbędne jest wprowadzenie opartych na siarce chemicznych modyfikacji (tiolacji) zasad azotowych tRNA. Poziomy tiolacji tRNA zmieniają się dynamicznie, co wpływa na to, jak komórki odpowiadają na zmienne warunki środowiskowe, a zarazem reguluje homeostazę białek.

Ubikwityno-podobny modyfikator (Ubiquitin-related modifier 1) (Urm1) jest odpowiedzialny za tiolację tRNA u eukariontów. Jak wykazały liczne badania, zmiany w enzymach szlaku Urm1 mogą prowadzić do poważnych chorób u ludzi. Ten sam szlak jest kluczowy dla funkcjonowania komórek nowotworowych, umożliwiając im dostosowanie się do stresu oksydacyjnego w trakcie ich progresji i przerzutów, nawet gdy są poddane terapii. Urm1, który odgrywa kluczową rolę jako białko nośnikowe siarki (SCP) w 2-tiolacji tzw. „pozycji wahadłowej” Urydyny 34 (U34), funkcjonuje również jako białko ubikwitynopodobne (UBL). Aktywator białka ubikwitynopodobnego 4 (Uba4) inicjuje dwuetapowy proces obejmujący adenylację, a następnie tiokarboksylację C-końca Urm1. Ta aktywowana forma Urm1, znana jako Urm1-SH, może służyć jako donator siarki dla specyficznych tiolaz tRNA lub też brać udział w ubikwityno-podobnej reakcji koniugacji. Zaobserwowano, że Urm1 przyłącza się do białek docelowych w odpowiedzi na stres oksydacyjny, a ponadto stwierdzono, że same enzymy szlaku Urm1 mogą być celami "urmylacji". Niemniej jednak, mechanizm przyłączania i sposób, w jaki właściwości SCP Urm1 mogą wpływać na jego koniugację, pozostają niejasne. Uba4 odgrywa zasadniczą rolę w aktywacji Urm1, jednak strukturalne i mechanistyczne aspekty tej reakcji enzymatycznej nie zostały do tej pory wyjaśnione. Aby zrozumieć rozbieżności między UBL a SCP, konieczne jest poznanie molekularnego podłoża tego procesu. W niniejszej pracy przedstawiam strukturę krystaliczną kompleksu Uba4-Urm1 i pokazuję, jak dwie domeny Uba4 odpowiadają za rozpoznanie, wiązanie i tiokarboksylację Urm1 i jego C-końca. Dowodzę, że cykl reakcji jest znacznie usprawniony dzięki komunikacji między domenami katalitycznymi Uba4 i identyfikują istotny mechanizm redoks, który pozwala Uba4 zapobiegać koniugacji z własnym produktem, czyli aktywowanym Urm1-SH. Ponadto, moja praca nad Urm1 dostarcza wglądu w ewolucyjne aspekty tworzenia tioestrów pomiędzy wszystkimi eukariotycznymi enzymami E1 i ich odpowiednimi UBL. Odtwarzam również kowalencyjne przyłączenie Urm1 do białek docelowych *in vitro*. W przeciwieństwie do innych znanych białek ubikwitynopodobnych, Urm1 nie angażuje enzymów koniugacyjnych E2 ani ligaz E3. Urm1 może przyłączać się do reszt lizyny, seryny i treoniny białek docelowych w warunkach stresu oksydacyjnego. Demonstruję również struktury krystaliczne drożdżowej peroksydoksyny Ahp1 przed i po przyłączeniu Urm1. Najbardziej zaskakującym wynikiem mojej pracy było odkrycie, że Urm1 może przenieść atom siarki do białka docelowego podczas reakcji koniugacji, co prowadzi do persulfidacji reszt cysteinowych w białku docelowym.

Podsumowując, moje badania rekonceptualizują system Uba4-Urm1 jako centralny ewolucyjny pomost pomiędzy licznymi modyfikacjami UBL występującymi u eukariontów i prokariotycznych SCP, jednocześnie ujawniając jego istotną rolę w ochronie białek przed łagodnym stresem oksydacyjnym.

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



Sebastian Glatt, PhD